

**Aus der
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Herr Prof. Dr. med. H.- J. Möller

Das RGS4-Gen in der Schizophrenie

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dr. Univ.Zahedan Javad Davodyfar

Aus
Sabzevar

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. D. Rujescu

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. M. Dichgans

Priv. Doz. Dr. J. Winkelmann

Mitbetreuung durch PD Dr. med. Dan Rujescu

Dekan Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2006



Gut denken, gut sprechen, gut handeln
Zarathustra

Diese Doktorarbeit widme ich meiner Freundin Jutta Brüggen.

Ohne ihre Hilfe hätte ich es nicht geschafft.

Ich danke ihr.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	6
2	Einleitung	8
2.1	Die Schizophrenie	8
2.2	Regulator von G-Protein Signaling 4	18
2.2.1	Entdeckung und Definition der RGS-Regulatoren in der G-Protein Signaling- Familie	18
2.2.2	Entdeckung und Definition von RGS4	21
2.2.3	Aufbau von RGS4	22
2.2.4	Dreidimensionale Abbildungen zur Struktur von RGS4	23
2.2.5	Funktion von RGS4	23
2.2.6	Expression von RGS4	25
2.2.7	RGS4 und Schizophrenie	28
3	Fragestellung	36
4	Material und Methoden	37
4.1	Material	37
4.1.1	Geräte	37
4.1.2	Software	38
4.1.3	Chemikalien	38
4.1.4	Polymorphismen	39
4.2	Methoden	39
4.2.1	Studienteilnehmer - Kontrollgruppe	39
4.2.2	Studienteilnehmer - Schizophrene Patienten	39
4.2.3	Zellkultur	40
4.2.4	DNA-Extraktion	45
4.2.5	Bestimmung der DNA-Konzentration	45
4.2.6	MALDI-TOF Massenspektrometrie	49
5	Ergebnisse	57
5.1	Analyse des Markers rs2661319 (SNP18) des RGS4-Gens	57
5.2	Analyse des Markers rs951436 (SNP 4) des RGS4 Gens	59
5.3	Analyse des Markers rs951439 (SNP 7) des RGS4-Gens	62
6	Diskussion	65
6.1	Überblick zu Design und Resultaten von Referenzstudien	65

6.2	Vergleich der untersuchten Einzel-Nukleotid-Polymorphismen mit den beschriebenen Studien	70
6.3	Abschließende Beurteilung der Ergebnisse der untersuchten Einzel-Nukleotid-Polymorphismen	73
6.4	Ausblick auf zukünftige Untersuchungen	77
7	Abkürzungen und Fachbegriffe	79
8	Literaturverzeichnis	82
9	Danksagung	99
10	Lebenslauf	100

1 Zusammenfassung

Die Schizophrenie ist eine schwerwiegende chronische psychiatrische Störung mit noch weitgehend ungeklärter multifaktorieller Ätiologie bei einer ausgeprägten Heritabilität und einem Lebenszeiterkrankungsrisiko von annähernd 1 %.

Bei der Suche nach kausalen chromosomalen Loci und Genen wurden multiple Gene mit jeweils nur geringen Beiträgen zur Entstehung und Ausprägung der Erkrankung gefunden. Bisher gelang aber noch kein Nachweis von klar pathogenetischen Mutationen. Eine definitive Bestätigung von spezifischen Genen als wahre Suszeptibilitätsgene für die Schizophrenie könnte das pathogenetische Verständnis verbessern und den Fortschritt in der gezielten Entwicklung neuer Medikamente sowie letztendlich in der Prävention unterstützen.

RGS4 ist ein Kandidatengen auf Chromosom 1, das sowohl in Kopplungs- wie auch Assoziationsstudien als Risikogen für Schizophrenie identifiziert wurde.

Die RGS-Genfamilie spielt eine signifikante Rolle in der Signalübertragung. Außerdem stellt sie ein Bindeglied zwischen Rezeptoren, Effektoren und anderen postsynaptischen rezeptor-regulierenden Komponenten dar und ist in Mechanismen der Neuroplastizität involviert. RGS4 ist am Konvergenzpunkt von mehreren Gi-, G-olf und Gq-gekoppelten Signaltransduktionswegen situiert und reguliert die Aktivität verschiedener Neurotransmittersysteme, wie z. B. von Dopamin-, Serotonin- und Glutamatrezeptoren.

Die Expression von RGS4 im Neokortex ist hoch und bei schizophrenen Patienten signifikant verringert.

In verschiedenen Assoziations- und Kopplungsstudien wurden signifikante Assoziationen zwischen RGS4 und Schizophrenie gefunden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Fall-Kontroll-Assoziationsstudie zur Untersuchung der Beziehung zwischen drei Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) des RGS4-Gens und der Schizophrenie an 184 deutschen schizophrenen Patienten und 184 deutschen gesunden Kontrollprobanden durchgeführt.

Die drei SNPs (rs2661319, rs951436, rs951439) wurden von Chowdari et al. (2002) in einer familienbasierten Assoziationstudie als mit der Schizophrenie signifikant

assoziiert beschrieben. Da es sich dort um ein amerikanisches und ein indisches Kollektiv handelte, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob sich die Ergebnisse in einem deutschen Kollektiv replizieren lassen.

Bei der Untersuchung von Allel- und Genotypfrequenzen konnte in der deutschen Population keine Assoziation mit der Schizophrenie ermittelt werden.

Die naheliegendste Erklärung für die Unterschiede zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und denen von Chowdari et al. ist die, dass es in den amerikanischen und indischen Populationen andere Risikoallele gibt, als in der deutschen.

Eine weitere Ursache könnte das unterschiedliche Testverfahren sein, da hier eine Studie mit nicht verwandten Kontrollprobanden durchgeführt wurde im Gegensatz zu der Studie von Chowdari et al., die elterliche Kontrollen miteinbezog.

Trotz einer sehr sorgfältigen Auswahl sowohl des Patienten- als auch des Kontrollkollektivs in dieser Studie könnten auch diagnostische Unterschiede verantwortlich sein.

Sowohl die Heterogenität der Krankheit, als auch die Heterogenität der sie möglicherweise verursachenden Gene sind weitere Gründe für differierende Resultate.

2 Einleitung

2.1 Die Schizophrenie

Die Schizophrenie ist eine sehr heterogene psychische Erkrankung, da sie sowohl symptomatisch als auch neuropathologisch sehr vielfältig ist. Charakteristische Symptome sind Wahn, Halluzinationen, formale Denkstörungen, Ich-Störungen, Affektstörungen und psychomotorische Störungen (Möller und Deister 2000).

Symptomatik und Verlauf der Schizophrenie

Zur Kategorisierung der komplexen Symptomatik der Schizophrenie wurden unterschiedliche Einteilungsversuche entwickelt, die für die Diagnose schizophrener Psychosen von großer Bedeutung sind. Die Einteilung in klinische Subtypen wurde bereits 1896 von Emil Kraepelin in seiner ersten Beschreibung der *Dementia praecox* dargestellt und erfolgte je nach Verlauf und vorherrschender Symptomatik in hebephrene, katatone oder paranoid-halluzinatorische Schizophrenie (Diefendorf 1902, Kraepelin 1896). 1908 entwickelte Eugen Bleuler eine Einteilung der Symptomatik in Grund- und akzessorische Symptome. Zu den Grundsymptomen zählte Bleuler Assoziationsstörungen, Affektstörungen, Autismus und Ambivalenz; zu den akzessorischen Halluzination, Wahn und katatone Symptomatik (Möller und Deister 2000). Seit den 70er Jahren werden die Symptome der schizophrenen Psychosen auch in positive und negative Symptome differenziert. Zu den positiven Symptomen zählen Halluzination, Wahn, formale Denkstörungen sowie desorganisiertes Verhalten und zu den negativen Alogie, Affektverarmung, sozialer Rückzug und Aufmerksamkeitsstörungen (Andreasen und Olsen 1982, Crow 1980). Das Konzept der Schizophrenie in den heutigen Klassifikationssystemen ICD-10 (International Classification of Diseases, 10. Fassung) und DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (Fourth Edition)) basiert im Wesentlichen auf dem Ansatz von Kraepelin. Es wurde allerdings bezüglich internationaler Konsensfindung, Einbeziehung moderner empirischer Untersuchungsergebnisse und Notwendigkeit der Operationalisierung modifiziert (Möller 2001). Die nosologische Einteilung erfolgt in der ICD-10 Klassifikation nach klinischen Syndromen: der

paranoiden, hebephrenen, katatonen und undifferenzierten Schizophrenie Zusätzlich unterscheidet man auch postschizophrene Depression, schizophreses Residuum und Schizophrenia Simplex. Das amerikanische Diagnosesystem DSM-IV klassifiziert nach fünf Haupttypen: dem paranoiden, desorganisierten, katatonen, undifferenzierten und residualen Typus (Möller und Deister 2000).

Bezüglich des Verlaufs ist die Schizophrenie eine schwerwiegende psychiatrische Erkrankung. Obwohl sich prognostisch günstige und ungünstige Faktoren herausgestellt haben, ist es nicht möglich, zu Beginn der Erkrankung eine Prognose für den Einzelfall zu erstellen.

Epidemiologie der Schizophrenie

Die Schizophrenie hat eine weltweite Lebenszeitprävalenz von ca. 1 %. Das Ersterkrankungsalter liegt in der Regel zwischen dem 18. und 30. Lebensjahr. Zwei epidemiologische Charakteristika der Schizophrenie sind sehr gut belegt:

1. Die Prävalenzzahlen sind in unterschiedlichen Ländern der Welt mit unterschiedlichem soziokulturellen Hintergrund etwa gleich (Tsuang et al. 1995).
2. Das mittlere Ersterkrankungsalter von Männern liegt zwar um zwei Jahre früher als das von Frauen, die Lebenszeitprävalenz ist aber nicht geschlechtsabhängig (Jablensky und Cole 1997).

Seit über 100 Jahren forscht man nach den Ursachen der Schizophrenie und verfolgt dabei zahlreiche methodische Ansätze. Trotz intensiver Forschungsanstrengungen ist die Ätiologie der schizophrenen Erkrankungen nach wie vor ungeklärt.

Nach heutiger Vorstellung wird eine multifaktorielle Ätiopathogenese der Schizophrenie favorisiert.

Multifaktorielle Ätiopathogenese der Schizophrenie

Im Folgenden werden verschiedene Faktoren, die einen Einfluss auf das Entstehungsrisiko der Schizophrenie ausüben könnten, dargestellt.

Genetische Faktoren:

Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien zeigen, dass es eine starke genetische Komponente in der Ätiologie der Schizophrenie gibt.

Familienstudien zeigen, dass das Risiko, die Krankheit zu entwickeln, mit zunehmender genetischer Verwandtschaft zu einer schizophrenen Person zunimmt (McGuffin et al. 1995). Im Gegensatz zu einem Risiko von 1 % in der allgemeinen Bevölkerung haben Verwandte dritten Grades ein Risiko von ca. 2 %, an Schizophrenie zu erkranken. Verwandte zweiten Grades zeigen ein Risiko von 6 %, und bei Verwandten 1. Grades steigt das Risiko auf bis zu 9 % an (Tsuang et al. 2001). Familienstudien setzen die Ähnlichkeit zwischen Eltern und ihrer genetisch verwandten Nachkommenschaft sowie zwischen zusammenlebenden Geschwistern voraus. Dabei kann die Ähnlichkeit sowohl auf genetische als auch auf Einflüsse der gemeinsamen familiären Umgebung zurückgehen. Daher können Familienstudien keine Trennung von Genetik und Umweltfaktoren darstellen.

Zwillingsstudien zeigen, dass genetische Einflüsse einen bedeutsamen Beitrag zur familiären Häufung der Schizophrenie leisten. Sie vergleichen die Konkordanz für Schizophrenie bei monozygoten Zwillingen (MZ), die genetisch identisch sind, mit der Konkordanz bei zweieiigen Zwillingen, die nur ungefähr 50 % ihrer Gene teilen. In verschiedenen Studien konnte wiederholt eine Konkordanzrate bei monozygoten Zwillingen von etwa 40 – 60 % festgestellt werden, was signifikant höher ist als die Rate von 4 – 15 % bei dizygoten Zwillingen (DZ) (Cannon et al. 1998, Farmer et al. 1987, Franzek und Beckmann 1996, Kringlen 1976, Onstad et al. 1991). Dies ist ein weiteres Indiz für die genetische Rolle bei der Entstehung der Schizophrenie. Andererseits zeigt die durchschnittlich nur etwa 50%ige Konkordanz für Schizophrenie bei eineiigen Zwillingen, dass auch nichtgenetische Faktoren eine Rolle spielen.

Eine Erklärung hierfür wäre der Einfluss von Umwelteinflüssen wie Geburtskomplikationen, intrauterine Veränderungen und Virusinfektionen, aber auch soziale Faktoren und psychologischer Stress, der in der Pathogenese der Schizophrenie zusätzlich zu der genetischen Rolle diskutiert wird (McNeil et al. 2000, Tsuang 2000). In Annahme der multifaktoriellen Ätiopathogenese der Schizophrenie könnten diese Umweltfaktoren zusammen mit der genetischen Prädisposition die Ausbruchswahrscheinlichkeit der Schizophrenie begünstigen. Somit kann der Beginn einer schizophrenen Psychose als das Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels zwischen genetischer Komponente und Umwelt betrachtet werden.

Interessant ist auch die Tatsache, dass monozygote Zwillingspaare im Vergleich zu dizygoten in stärkerem Umfang eine gleiche Umgebung teilen. Sie sehen sich besonders ähnlich und haben das gleiche Geschlecht. Daher ist es durchaus vorstellbar, dass auch ihre Umwelt, z.B. die Eltern in ähnlicherer Weise auf sie reagieren und eventuell Unterschiede bezüglich ihrer Persönlichkeit vernachlässigen. Außerdem teilen sich monozygote Zwillinge nur eine Plazenta, d.h. sie haben die gleiche pränatale Umwelt und intrauterinen Variablen (Reiss et al. 1991). Dizygoten Zwillinge dagegen haben zwei Plazenten, so dass hier bei monozygoten Zwillingen die Heritabilität überschätzt werden könnte.

Adoptionsstudien stellen die beste Methode dar, um genetische und umweltbedingte Faktoren einer Familie zu trennen. Sie liefern Hinweise dafür, dass die familiäre Häufung nicht das Ergebnis von gemeinsamen Umweltfaktoren, sondern überwiegend durch genetische Faktoren bedingt ist. Dafür spricht, dass unbelastete Kinder, die früh in eine Familie mit schizophrenem Elternteil adoptiert wurden, nicht unter einem gesteigerten Risiko der Schizophrenieentwicklung litten. Dagegen behielten früh adoptierte Kinder, die von an Schizophrenie erkrankten Eltern stammten, ihr gesteigertes Schizophrenierisiko bei, obwohl es keine schizophrenen Eltern in der Familie gab, in die sie adoptiert wurden (Kendler et al. 1994, Kety et al. 1994).

Bis heute sind die Grenzen der in Familien übertragenen Phänotypen nicht eindeutig definierbar. Die klinischen Subtypen (paranoid, hebephren, kataton) zeigen keine sicher reproduzierbare familiäre Homogenität (Kendler und Diehl 1993). Familienstudien konnten zeigen, dass v.a. Probanden mit ausgeprägter sogenannter Negativsymptomatik familiär mit psychotischen Störungen belastet sind (Kendler et al. 1995, van Os et al. 1997). Außerdem waren in einer Zwillingstudie, bei der nach Positiv- und Negativsymptomatik differenziert wurde, die konkordanten Zwillinge häufiger mit vermehrten Negativsymptomen, schlechterer prä-morbider Anpassung und weniger paranoider Symptomatik belastet als die diskordanten Paare (Dworkin et al. 1988). Das lässt auf eine stärkere genetische Komponente der Negativsymptomatik schließen.

Molekulargenetik der Schizophrenie

Der relative Einfluss von genetischen Faktoren in der Ätiologie der Schizophrenie wird auf etwa 45 – 75 % geschätzt (Cannon et al. 1998, Farmer et al. 1987, Franzek und Beckmann 1996, Kringlen 1976, Onstad et al. 1991).

Die Schizophrenie gehört zu den genetisch komplexen Erkrankungen wie Alkoholismus, affektive Störungen (Maier und Schwab 1999), Hypertonie, koronare Herzerkrankung oder Diabetes mellitus (Lander und Schork 1994). Das Vererbungsmuster ist komplex und folgt nicht den Mendelschen Vererbungsregeln (McGue und Gottesman 1989). Das zurzeit plausibelste formalgenetische Modell der Schizophrenie geht von einer polygenen Übertragung aus. Die genetische Komponente besteht wahrscheinlich aus verschiedenen Genen, von denen jedes einzelne nur einen geringen Einfluss auf die Erkrankung hat (Owen 2000). Hier sind also gleichzeitig mehrere Mutationen an verschiedenen Loci für das Auftreten der Schizophrenie verantwortlich. Jedes der beteiligten Gene leistet nur einen kleineren Teil zum Erkrankungsrisiko. Hinweise auf Hauptgene, die einen größeren Beitrag als andere leisten, sind bisher noch nicht entdeckt worden.

Zusätzlich ist eine genetische Heterogenität anzunehmen, bei der verschiedene Mutationen an verschiedenen Genorten dasselbe Merkmal, also Schizophrenie, hervorrufen können. Jedoch sind die sich daraus ergebenden, ätiologisch unterschiedlichen möglichen Varianten derzeit nicht mit klinischen Mitteln zu differenzieren (Maier et al. 1999).

Aufgrund der überzeugenden Hinweise auf die Rolle, die genetische Mechanismen in der Pathogenese der Schizophrenie spielen, wurde die Entdeckung von Schizophreniegenen seit den 80er Jahren verfolgt. Angespornt wurde sie durch die erfolgreiche Anwendung der bisher vor allem bei monogenen Erkrankungen eingesetzten molekulargenetischen Technik der Polymerasekettenreaktion (PCR) und der Entwicklung von polymorphen DNA-Markern, mittels derer unterschiedliche Genformen (Allele) auf Chromosomen nachgewiesen werden können (Tsuang et al. 1999). Kurz nach Beginn des dritten Jahrtausends wurde das humane Genom fast vollständig entschlüsselt. Ein wichtiges Ziel des Humangenomprojekts stellt die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen humaner DNA-Sequenzvariabilität, Phänotypvariabilität und komplexen Erkrankungen, wie der Schizophrenie, dar (Collins et al. 1998).

Bisher sind für Schizophrenie die Anzahl an prädisponierenden Genorten, das von jedem Genort übertragene anteilige Risiko und der Grad der Wechselwirkung zwischen den Genorten unbekannt. Daher bietet das Auffinden von Risikogenen für Schizophrenie eine bedeutende Herausforderung, wenn man davon ausgeht, dass die Pathobiologie der Schizophrenie weit davon entfernt ist, verstanden zu werden. Trotz dieser Schwierigkeiten sind zwei Wege möglich, um auf Genomebene nach prädisponierenden Genen für Schizophrenie zu suchen:

Kopplungsstudien, die nicht auf bestimmten biologischen Hypothesen beruhen und innerhalb von Familienstudien darauf angelegt sind, chromosomale Regionen zu identifizieren, die prädisponierende Genorte enthalten, und Assoziationsstudien, die sensitiv genug sind, um geringere Geneffekte herauszufinden, aber auf die Auswahl von plausiblen Kandidatengen angewiesen sind.

Beide Methoden stellen prinzipiell komplementäre Ansätze zur Identifikation von Suszeptibilitätsgenen für komplexe Erkrankungen dar.

Kopplungsuntersuchungen zur Schizophrenie

In Kopplungsstudien wird getestet, ob ein Markerallel innerhalb einer Familie überzufällig häufig zusammen mit einer Krankheit vererbt wird. Es wird eine Abweichung von den Mendelschen Regeln innerhalb von Stammbäumen gemessen. Die ersten Kopplungsuntersuchungen zur Schizophrenie wurden in der Annahme durchgeführt, dass Gene mit einer Hauptwirkung identifiziert werden können. Erste positive Ergebnisse für Kopplungen, z.B. mit einem Gen auf Chromosom 5, konnten jedoch nicht repliziert werden (Bassett et al. 1988, Sherrington et al. 1988). Vermutlich sind Mutationen mit einer sehr hohen Penetranz äußerst selten oder nicht vorhanden (McGuffin und Owen 1996). Daraufhin wurden große gemeinschaftliche Anstrengungen unternommen, um systematische Linkagestudien über das gesamte Genom hinweg durchzuführen. In den letzten Jahren wurden zwar tendenzielle bis signifikante Kopplungen gefunden, allerdings waren die gefundenen Kandidatengenregionen jeweils sehr breit (etwa 30 Centimorgan (cM)) und konnten häufig durch unabhängige Gruppen nicht repliziert werden.

O'Donovan et al. 2003 werteten die Daten einer großen Anzahl genomweiter Kopplungsstudien zur Schizophrenie aus und fanden eine größere Übereinstimmung in den Ergebnisse der bisherigen Kopplungsstudien als bislang vermutet. Interessanterweise konnte diese Analyse verschiedene Hinweise auf Kopplungen

bestätigen, die an einer kleineren Anzahl von Stammbäumen aus homogeneren oder isolierteren Bevölkerungsgruppen beobachtet wurden. Die Ergebnisse werden in Tabelle 1 dargestellt:

Tab 1: Zusammenfassung der unterstützenden Hinweise aus Kopplungsuntersuchungen für die hauptsächlichsten Schizophrenie-Suszeptibilitätsregionen (aus O'Donovan et al. 2003).

Kopplungsregion	Unterstützende Studie	Untersuchte Population	Gefundene Region	Statistischer Beweis
1q21–22	Brzustowicz et al. (2000)	Kanada, Island/UK	1q21–22	MLS =6.5*
	Gurling et al. (2001)		1q22–23	MLS =3.2
1q42	Hovatta et al. (1999)	Finnland (isoliert), Finnland (allg. Bevölkerung), UK	1q32.2–q41	Z _{max} =3.8
	Ekelund et al. (2000)		1q42 1q42	MLS =2.51
	Blackwood et al. (2001)			MLS =3.6
5q21–33	Schwab et al. (1997)	Deutschland /Israel	5q31	MLS =1.8
	Camp et al. (2001)	Palau	5q22-qter	MLS =2.5
	Gurling et al. (2001)	Island/UK	5q33.2	MLS =3.6
	Straub et al. (2002)	Irland	5q21–31	NPL =2.65
	DeLisi et al. (2002)	Costa Rica	5q21–31	MLS =1.78
	Paunio et al. (2001)	Finnland (allg. Bevölkerung)	5q33	Z _{max} =3.16
6p24–22	Moises et al. (1995)	Island	6p22	P=0.005
	SCLG. (1996)	Multizenter-Zusammenarbeit	6p22–24	MLS =2.19
	Straub et al. (2002)	Irland	6p25–22	NPL =3.59*
	Schwab et al. (2000)	Deutschland/Israel/Ungarn	6p	NPL =3.3
6q21–25	Cao et al. (1997)	Eur-Amerik./Afr-Amerik.	6q21–q22.3	MLS =3.06
	Kaufmann et al. (1998)	Afr-Amerikanisch	6q16–24	NPL =1.89
	Martinez et al. (1999)	Eur-Amerik./Afr-Amerikanisch	6q16–21	MLS =3.18
	Levinson et al. (2000)	Multizenter-Zusammenarbeit	6q21	MLS =3.1
	Lindholm et al. (2001)	Schweden	6q25	MLS =6.6*
	Lerer et al. (2003)	Israel	6q23	NPL =4.6*
	SCLGF. (1996)	Multizenter-Zusammenarbeit	8p21–22	MLS =2.22
8p22–21	Blouin et al. (1998)	Eur-Amerik./Afr-Amerikanisch	8p21–22	NPL =3.64
	Kaufmann et al. (1998)	Afr-Amerikanisch	8pter–q12	NPL =2.27
	Brzustowicz et al. (2000)	Kanada	8p21	MLS =2.8
	Gurling et al. (2001)	Island/UK	8p22.1–22	MLS =3.6
	Garver et al. (2001)	Eur-Amerik./Afr-Amerikanisch	8p23	NPL =1.86
	Straub et al. (2002)	Irland	8p22–21	NPL =2.56
	Stefansson et al. (2002)	Island	8p12–21	MLS =2.53
	Faroane et al. (1998)	Eur-Amerikanisch	10p11–15	NPL =3.36
	DeLisi et al. (2002)	Europa/Chile	10p12	Z _{max} =3.6
	Schwab et al. (2000)	Deutschland/Israel/Ungarn	10p12	NPL =3.13
13q32–34	Straub et al. (2002)	Irland	10p15–11	NPL =1.78
	Blouin et al. (1998)	Eur-Amerik./Afr-Amerikanisch	13q32	NPL =4.18*
	Brzustowicz et al. (2000)	Kanada	13q31–32	MLS =3.81
22q11–12	Gill et al. (1996)	Multizenter-Zusammenarbeit	22q12	X ² =9.31, P=0.001
	Blouin et al. (1998)	Eur-Amerik./Afr-Amerikanisch	22q11	NPL =2.42
	DeLisi et al. (2002)	Europa/Chile	22q12–13	Z _{max} =2.0

*Zeigt an, dass die Studie den Kriterien für einen genomumfassenden Kopplungsbeweis, d.h. $P < 0,05$, genügt;

MLS = Maximum LOD (logarithm of the odds) Score;

NPL = Non-Parametric-Linkage;

Z_{max} = Maßeinheit für das Vertrauen in ein statistisches Ergebnis, ist

Z_{max} > 3, gilt die Kopplung vereinbarungsgemäß als erwiesen.

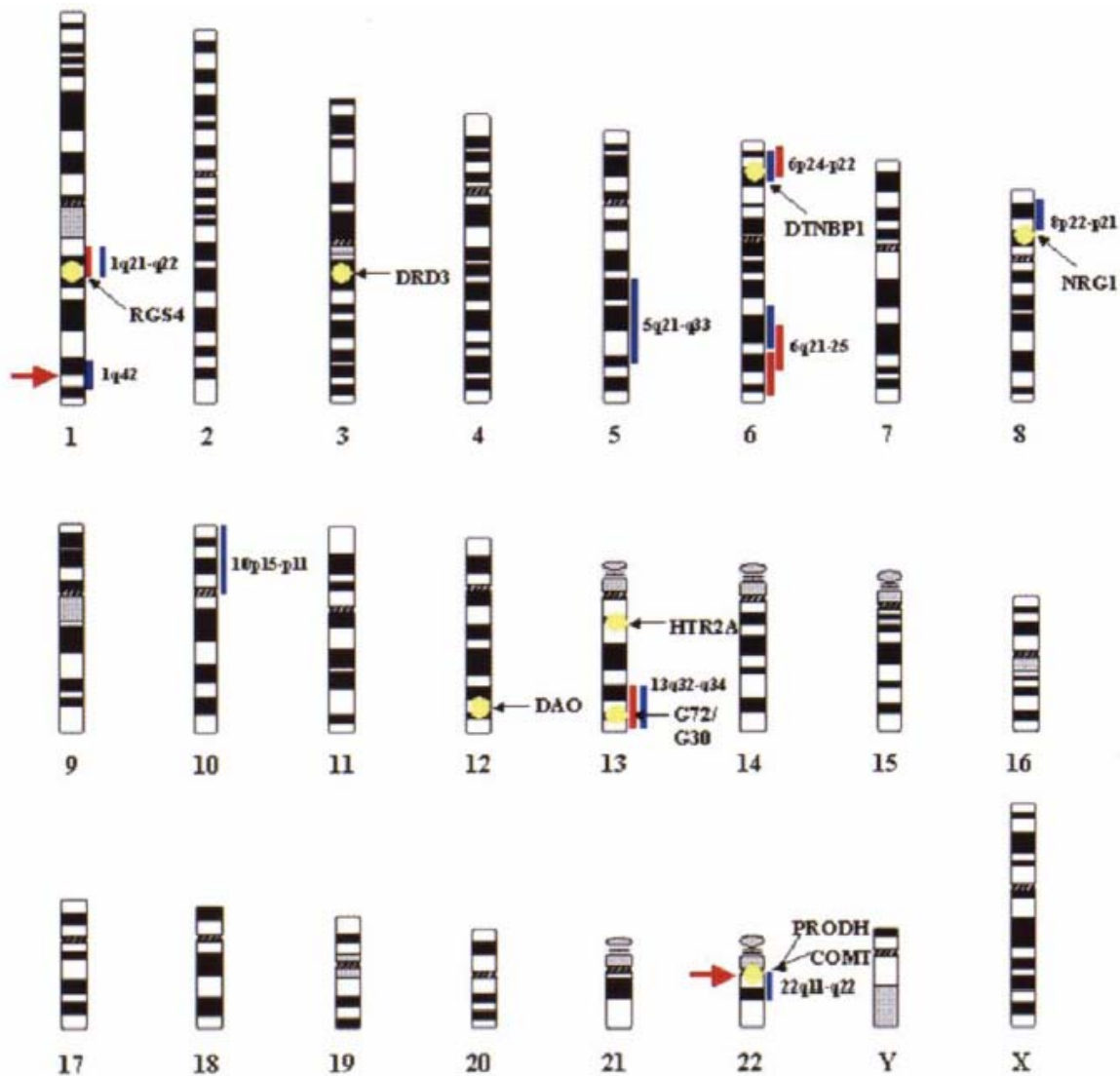


Abb.1 zeigt die wichtigsten chromosomalen Kandidatenregionen aus Schizophrenie-Kopplungsstudien. Die blauen Linien zeigen die Gebiete an, für die sich glaubwürdige Hinweise auf Kopplung in mehr als einer Untersuchung ergeben haben. Die roten Linien kennzeichnen die Gebiete, für die sich genomweite Signifikanz herausgestellt hat. Die roten Pfeile kennzeichnen die Regionen, für die chromosomale Abnormalitäten assoziiert mit Schizophrenie gefunden wurden. Die gelben Kreisflächen zeigen die Gen-Lokationen, die als mögliche Schizophrenie-Suszeptibilitäts-Loci gelten (O'Donovan et al. 2003)

Der Genabschnitt, der zusammen mit 6p24-22 (Straub et al. 1995) und 13q32-34 (Blouin et al. 1998) die stärkste Kopplung erreichte, ist auf Chromosom 1q21-22 (Brzustowicz et al. 2000) lokalisiert (Tab 1). 1q21-22 ist insofern ein sehr interessanter Befund, als das in dieser Arbeit untersuchte RGS4-Gen unmittelbar daneben, auf 1q23.2, liegt. RGS4 stellt unter anderem deshalb ein potentielles Kandidatengen für die Pathogenese der Schizophrenie dar. Weitere starke Hinweise für Kopplung konnten Lewis et al. (2003) in ihrer Metaanalyse auf Chromosom 2p12-q22.1, 2q22.1-q23.3, 5q23.2-q34, 3p25.3-p22.1, 11q22.3-q24.1, 6pter-p22.3, 6p22.3-p21.1, 1p13.3-q23.3, 22pter-q12.3, 8p22-p21.1, 20p12.3-p11 und 14pter-q13.1 finden. Diese Meta-Analyse bestätigt die Hypothese, dass mehrere Genorte von signifikanter bis moderater Wirkung zur Suszeptibilität für Schizophrenie in

verschiedenen Bevölkerungsgruppen beitragen und die ermittelten chromosomalen Regionen das Risiko, diese Krankheit zu entwickeln, erhöhen.

Allerdings ist die Bedeutung der positiven Kopplungsbefunde erst dann abschließend zu beurteilen, wenn veränderte Gene und deren Krankheitsbedeutung *in vivo* nachgewiesen werden können. Leider ist die Methodik der Kopplungsstudien nicht empfindlich genug, die Risikogene mit geringem Beitrag zur Krankheitsentstehung nachzuweisen, da die eingrenzbaeren Genregionen noch zu groß sind (ca. 1 Mega-Basenpaar (mbp)).

Assoziationsstudien

Assoziationsanalysen liefern einen alternativen Ansatz zur Identifizierung solcher Gene. Sie stellen eine empfindliche Methode zum Nachweis von Suszeptibilitätsgenen mit einem geringen Einfluss auf die Krankheit dar, wie es bei Schizophrenie der Fall ist. Ihr Ziel ist es, auf Populationsebene durch Vergleich einer Fall- mit einer Kontrollgruppe funktionell relevante Genvarianten (Allele), denen bei der Entstehung der Schizophrenie eine mögliche Rolle zugeschrieben wird, mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko in Zusammenhang zu bringen.

Die meisten Assoziationsstudien beruhen auf den derzeitigen pathobiologischen Modellen der Schizophrenie. Untersucht werden so genannte Kandidatengene, von denen man annimmt, dass ihre Produkte an der Entstehung der Krankheit beteiligt sein könnten (Tabelle 2). Daher haben sie sich zunächst auf Modelle der dopaminergen Dysfunktion konzentriert. Sowohl die Dopaminhypothese der Schizophrenie als auch die Tatsache, dass Dopaminrezeptoren von den meisten Neuroleptika blockiert werden, geben Anlass zur Erforschung von Genen, die an der dopaminergen Neurotransmission beteiligt sind. In diesen Studien werden Gene untersucht, die sowohl für Dopaminrezeptoren als auch für die Enzyme, die in den Dopaminmetabolismus involviert sind, kodieren. So deutet beispielsweise eine Meta-Analyse von >5000 Personen auf eine Assoziation zwischen Schizophrenie und Homozygotie für einen Einzel-Nukleotid-Polymorphismus (SNP) hin, welcher eine Aminosäurevariation (Ser9Gly) im Exon 1 des Dopamin 3 (DRD3) -Rezeptorgens verursacht (Williams et al. 1998).

Weiterhin wurde das serotonerge System untersucht, da Lysergsäurediethylamin (LSD), welches schizophrenieähnliche Symptome erzeugt, an den Serotonin- (5-HT)-2A-Rezeptor bindet. Außerdem haben atypische Neuroleptika neben dem Dopamin-

D2-Antagonismus v.a. einen 5-HT-2A-Antagonismus. Eine Meta-Analyse über einen Basenaustausch-Polymorphismus von Thymin (T) nach Cytosin (C) an Position 102 im Serotonin-2A (5-HT-2A) -Rezeptorgen zeigte ebenfalls eine Assoziation mit Schizophrenie (Inayama et al. 1996, Williams et al. 1997).

Ein weiterer interessanter Befund ist die Entdeckung des in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gens RGS4 (Regulator of G-Protein signaling 4) auf Chromosom 1q21-22 (Brzustowicz et al. 2000), das bis vor kurzem nicht mit Schizophrenie in Zusammenhang gebracht wurde. 2001 konnte in einer Studie eine Verminderung der Expression des RGS4 mRNA Transkripts an *post mortem*-Hirnen Schizophrener beobachtet werden (Mirnics et al. 2001). Auch Hinweise auf Kopplung dieses Gens mit Schizophrenie wurden beobachtet (Brzustowicz et al. 2000). Weiterhin konnte eine Assoziation mit genetischen Varianten des RGS4-Gens gezeigt werden (Chowdari et al. 2002).

Schließlich deuten verschiedene Befunde auf Veränderungen im glutamatergen System in der Pathogenese der Schizophrenie hin.

In einem genomweiten Screening replizierten Stefansson et al. (2002) Ergebnisse von Kopplungsstudien mit Schizophrenie auf Chromosom 8p an einer isländischen Bevölkerungsgruppe (Stefansson et al. 2002). Des Weiteren entdeckten sie verschiedene Marker auf dem Neuregulin 1 (NRG 1) -Gen und bildeten einen Haplotypen, der eine signifikante Assoziation mit Schizophrenie zeigte. Ein fast identisches Muster konnte an einer schottischen Bevölkerungsgruppe repliziert werden (Stefansson et al. 2003). Neuregulin-1-Knockoutmäuse haben weniger funktionelle NMDA-Rezeptoren.

Straub und Kollegen untersuchten einen Bereich auf Chromosom 6p, der in irischen Familienstudien gekoppelt war und entdeckten mittels familienbasierten Assoziationsstudien von SNPs und Haplotypen das Dysbindin (DTNBP1) -Gen auf Chromosom 6p22.3. Es kann u. a. die NMDA-Rezeptorfunktion über die neuronale Nitrosyl (NO) -Synthese beeinflussen. Sie fanden hochsignifikant assoziierte SNPs in den Introns 4, 5 und 6 (Straub et al. 2002), was auch in einer weiteren deutschen Studie bestätigt werden konnte (Schwab et al. 2003).

Mit diesen Befunden ist ein großer Schritt in Richtung Qualität und Quantität der Beweislage zum genetischen Beitrag zur Schizophrenie geleistet worden. Für jedes Gen zeigte mehr als ein SNP Assoziation mit Schizophrenie. Es bedarf nun weiterer unabhängiger Replikationen, um diese Ergebnisse endgültig zu bestätigen.

Tab 2: Genetische Assoziationsstudien zur Schizophrenie

Pathobiologisches Modell der Schizophrenie	Gen	Zytogenetische Lokalisation	Studie
Dopaminhypothese der Schizophrenie	DRD3	3q13.3	(Williams et al. 1998)
	DRD2	11q23	(Breen et al. 1999)
	COMT	22q11.21-q11.23	(Shifman et al. 2002)
Serotoninhypothese der Schizophrenie	5-HT-2A	13q14-q21	(Inayama et al. 1996; Williams et al. 1997)
Glutamathypothese der Schizophrenie	NRG1	8p12-p21	(Stefansson et al. 2003)
	DTNBP1	6p22	(Schwab et al. 2003; Straub et al. 2002)
zuvor nicht mit Schizophrenie in Verbindung gebracht	RGS4	1q21-22	(Brzustowicz et al. 2002)

Auf der Suche nach interessanten Kandidatengen für die Entstehung der Schizophrenie wurde in der vorliegenden Arbeit das Gen RGS4 (Regulator of G-Protein Signaling-4) untersucht. Da zu den derzeitigen pathologischen Modellen der Schizophrenie dopaminerge und serotonerge Dysfunktionen gehören und RGS4 Mitglied einer Gruppe von Proteinen ist, die eine wichtige Rolle in der Regulation der Dauer der postsynaptischen Signale verschiedener G(Guanin)-Protein gekoppelter Neurotransmitter-Rezeptoren, wie dem Dopamin-D2, 5-HT2- und metabotropem Glutamatrezeptor spielen, stellt es ein Kandidatengen für die Entstehung der Schizophrenie dar.

Im Folgenden soll die Bedeutung des RGS4-Gens in der Pathogenese der Schizophrenie erläutert werden.

2.2 Regulator von G-Protein Signaling 4

2.2.1 Entdeckung und Definition der RGS-Regulatoren in der G-Protein Signaling-Familie

Die Regulatoren von G-Protein Signaling (RGS) sind eine in jüngster Zeit entdeckte stark diversifizierte Klasse von Proteinen (Kolle et al. 1997), die die Aktivität der G-Proteine (Guanin-Proteine) modulieren. G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) spielen eine signifikante Rolle in der Signalübertragung. Bei Krankheiten wie

Parkinson, Depression und Schizophrenie bilden sie das Ziel für zentral wirksame Arzneimittel (Seeman et al. 1975; Liebermann et al. 1998).

Tierversuche haben gezeigt, dass RGS Proteine im ganzen Körper vorkommen (De Vries et al. 2000; Zheng et al. 1999), viele davon mit deutlichen Expressionsmustern im Gehirn (Gold et al. 1997). Es gibt mehr als 20 Subtypen, allen ist eine so genannte RGS Domäne von 120 Aminosäuren gemein. Abbildung 2 zeigt adaptierte Oberflächenrepräsentationen von RGS Domänen Interaktionen

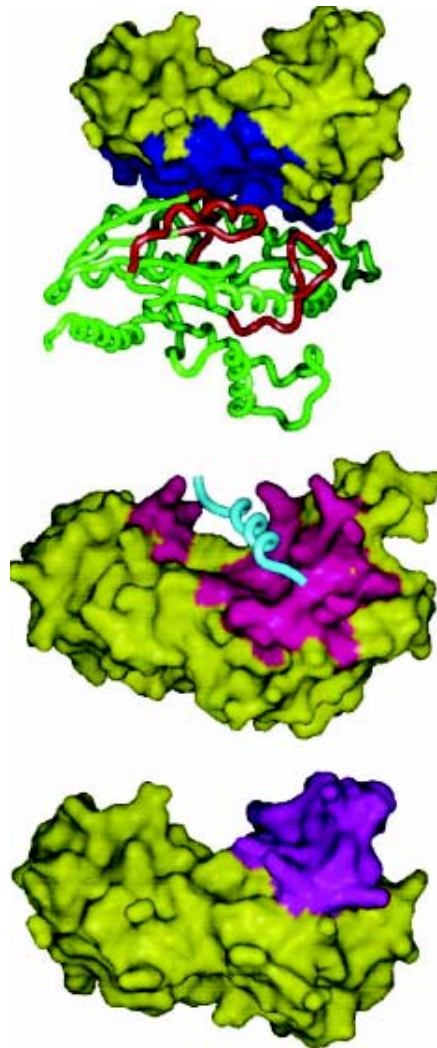


Abb. 2: Oberflächenrepräsentationen von verschiedenen RGS Domänen Interaktionen:

Abb. oben: zeigt die RGS Domäne von RGS4 (grün) im Komplex mit $G\alpha 1 \cdot GDP/AlF_4$ (grüne Spirale), adaptiert von der Kristallstruktur von Tesmer et al. (1997). Die Alpha-Untereinheit Switch Regionen (rot) interagieren mit der A-Seite (blau) der RGS Domäne.

Abb. Mitte: zeigt die RGS Domäne von Amin (grün) im Komplex mit der dritten SAMP- (Ser-Ala-Met-Pro) Wiederholung (SAMP3) des Adenomatösen Polyposis Coli (APC) Tumorsuppressor-Proteins, adaptiert von der Kristallstruktur von Spink et al. (2000). Das SAMP3 Peptid (türkis) interagiert mit der B-Seite (zyklamen) der RGS Domäne.

Abb. unten: zeigt potentielle Interaktionen von RGS4 und seines GAP-Aktivitätsmodulators Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (InsP3) und Ca^{2+} /Calmodulin, wie von Popov et al. (2000) definiert, (violett schattiert). Sie überlappen mit den Resten der B-Seite.

In anfänglichen Untersuchungen wurden die RGS Proteine als GTPase-beschleunigende Proteine, GAPs (GTPase accelerating Proteins), (Berman et al. 1996) beschrieben. Die GAP-Domäne des RGS Proteins interagiert mit der $G\alpha$

Untereinheit des G Proteins (Berman et al. 1996) und steigert die Hydrolyse von GTP (Abbildung 3).

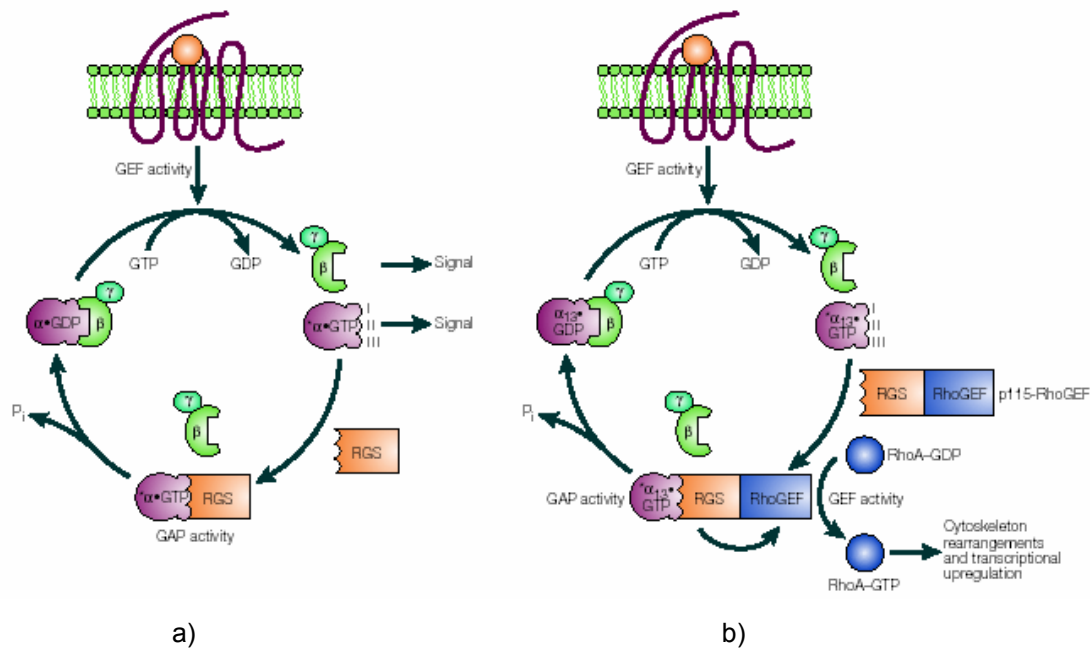


Abb.3 zeigt die duale Rolle von RGS Proteinen in der G-Protein gekoppelten Rezeptoren vermittelten Signalübertragung als Inhibitor und als Effektor

a) RGS Proteine als Gα GTP beschleunigende Proteine (GAPs):

Die Bindung von Agonisten an die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) steigert die Aktivität des Guanin-Nukleotid Exchange Faktors (GEF). Das führt zur Bindung von GTP an die Gα Untereinheit und zur Konformationsänderungen in der Gα Switch Region (I, II und III), wobei die aktive *α-Konformation produziert wird. Anschließend kommt es zur Dissoziation des Gα-Gβγ Komplexes und daraus resultierenden Effektor Interaktionen (in der Graphik als ‚Signal‘ bezeichnet). RGS Proteine reduzieren GPCR Signalübertragung, indem sie die GTP Hydrolyse mittels G-Protein-α-Untereinheit beschleunigen. Das führt zur Gα-Gβγ Reassoziierung. Hemmung der Bindung der RGS Domäne an Gα*GTP würde in diesem Fall zu einer verlängerten Lebenszeit der Gα Untereinheit in dem GTP-gebundenen Zustand führen und zu einer verstärkten rezeptorstimulierten Antwort mit höheren Mengen an freien Gα*GTP und Gβγ Untereinheiten.

b) RGS Proteine als Gα Effektoren:

RGS Proteine können auch eine positive Rolle in der GPCR Signalübertragung spielen, z. B. im Fall der p115-RhoGEF und der dazugehörigen Proteine PDZ-RhoGEF und LARG. Indem aktiviertes G₁₃α gebunden wird, erhöht sich die GEF Aktivität von p115-RhoGEF. Das führt zur RhoA Aktivierung und resultiert in abwärts gerichteten Effekten von zytoskeletaler Neuordnung und transkriptionaler Regulation. P115-RhoGEF deaktiviert auch G₁₃α mittels RGS-box GAP-Aktivität. Allerdings muss das Signal erst vorwärts gesendet werden. In diesem Fall sollte das Blockieren der RGS-box Gα-Interaktion mittels Intervention kleiner Moleküle die G₁₃α abhängige RhoA-Aktivierung reduzieren. LARG = Leukämie-Assoziiertes-RhoGEF; P_i = Phosphatgruppe; RGS = Regulator of Protein Signaling (Berman et al. 1996; Hunt et al. 1996; Watson et al. 1996).

Die RGS-Proteine agieren also als negative Regulatoren der GPCR Signalübertragung. Das bedeutet: Sie beschleunigen die Hydrolyse des an G-Proteine gebundenen GTPs und verkürzen damit die Dauer der intrazellulären Signaltransduktion vieler G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCRs), wie Dopamin, GABA, Glutamat und anderer Neurotransmitter. Alle größeren biogenen Amine und Aminosäuren-Neurotransmitter übertragen in unterschiedlichem Ausmaß Signale via Guanin-Nukleotid-Protein gekoppelter Rezeptoren.

Später stellte sich heraus, dass die Funktion der RGS Proteine ausgedehnter ist:

- Sie steigern G-Protein-Aktivität, dienen als intrazelluläre Effektor-Moleküle und agieren als Gerüstproteine um Rezeptoren, G-Proteine, Effektoren und andere

postsynaptische Rezeptor regulierende Komponenten zu verbinden (Zhong et al. 2001).

- Sie sind involviert in Neuroplastizität (Ingi et al. 1998).
- Ihr Expressionsgrad verändert sich unter Einfluss von Stress (Ni et al. 1999) und der Verabreichung von Psychostimulantien (Burchett et al. 1998, 1999).
- Sie sind wahrscheinlich auch an Desensibilisierungsprozessen beteiligt (Weiland et al. 1999).

Eine primäre Funktion der RGS Proteine ist die Beendigung von G-Protein stimulierten Signalen. Der Beginn der Rezeptoraktivierung mittels eines endogenen Liganden und das Ende dieser Rezeptoraktivierung mittels eines RGS-Proteins sind beides Prozesse, die innerhalb des neuronalen Systems bei Säugetieren anscheinend entscheidend vom rechtzeitigen Informationsfluss abhängen. Der Befund, dass viele RGS-Proteine in verschiedenen Teilen des Gehirns expremiert werden (Gold et al. 1997) deutet auf die potentielle Bedeutung dieser Proteine in der Regulation neuronaler Signalübertragungswege, auf ihre potentielle Rolle bei zentral wirksamen Arzneimitteln und ihre mögliche Rolle in der Pathophysiologie der Schizophrenie hin.

2.2.2 Entdeckung und Definition von RGS4

Das RGS4-Gen ist eins der als erstes beschriebenen Mitglieder der *Regulator of G Protein Signaling* (RGS) Familie.

Es wurde zum ersten Mal 1996 aus menschlichem Gewebe gewonnen (RGS4 Human, P49798, EMBL Bioinformatic Harvester).

Es enthält eine RGS Domäne, die aus 117 Aminosäuren besteht und stimmt zu 97 % mit Ratten-RGS4 und zu 37 % mit RGS1 überein.

Es besteht aus 205 Aminosäuren (Abbildung 4).

```
MCKGLAGLPA SCLRSKDMK HRLGFLLQKS DSCEHNSSHN KKDKVVICQR VSQEEVKKWA 60
ESLENLISHE CGLAAFKAFL KSEYSEENID FWISCEEYKK IKSPSKLSPK AKKIYNEFIS 120
VQATKEVNLD SCTREETSRN MLEPTITCFD EAQKKIFNLM EKDSYRRFLK SRFYLDLVNP 180
SSCGAEKQKG AKSSADCASL VPQCA 205
```

Abb. 4: Aminosäuresequenz von RGS 4.

Das Ergebnis der vorausgegangenen genomweiten Kopplungsuntersuchungen an Familien mit Schizophrenie unterstützte die Auffassung einer Kopplung der Schizophrenie zum chromosomalen Locus 1q 21 - 22. Durch Kopplungs- und Assoziationsstudien wurde RGS4 an Position 1q23.2 als Kandidatengen der Schizophrenie identifiziert (Abbildung 5).



Abb. 5: Darstellung von Chromosom 1 mit Position des RGS4-Gens (rot)

2.2.3 Aufbau von RGS4

Das RGS4-Gen (Abbildung 6) enthält 5 Exons und umspannt 7.5 Kilobasen (Kb) (Shirts et al. 2005).

Das Genprodukt, das RGS4-Protein, ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 23255 Dalton (Strausberg et al. 2002; Puhl et al. 2002).

Das RGS4-Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 1 innerhalb einer ca. 300 Kilobasen (kb) langen Region (Chowdari et al. 2002) unmittelbar neben dem Chromosomenlocus 1q21-22 auf 1q23.2 (NCBI accession number U27768, UniGene cluster Hs.227571), der Chromosomenregion, die am stärksten mit Schizophrenie gekoppelt ist (Brzustowicz et al. 2000), lokalisiert.

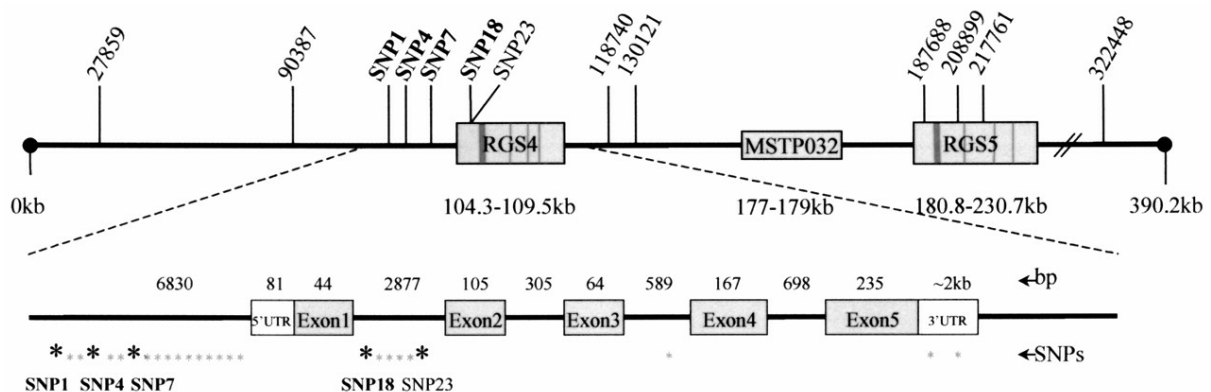


Abb. 6: Genomorganisation von RGS4 und angrenzenden Regionen: Die Genomorganisation ist abgeleitet von verfügbaren Sequenzen des Klon NT 022030 und der Sequenzanalyse von Chowdari et al. (2002). Das ca. 8,5kb lange Gen besteht aus fünf Exons. Die SNPs, die in der Studie von Chowdari et al. analysiert wurden, sind im oberen Bereich aufgeführt. * SNPs wurden mittels Resequenzierung von RGS4 identifiziert; * identifizierte SNPs, die für die TDT Analyse benutzt wurden. SNP1, SNP4 = rs951436, SNP7 = rs951439, SNP18 = rs2661319, SNP23 = rs12087556

Von RGS4 wurden zehn genetische Varianten, Einzel-Nukleotid- Polymorphismen (SNP), von Chowdari et al. (2002) beschrieben. Laut Datenbank

<http://www.pitt.edu/AFShome/n/i/nimga/public/html/research/RGS4/> sind inzwischen vierzehn RGS4 SNPs validiert.

2.2.4 Dreidimensionale Abbildungen zur Struktur von RGS4

Abbildungen 7 und 8 zeigen dreidimensionale Strukturen von RGS4.

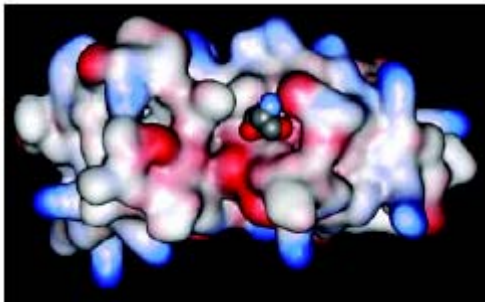


Abb.7: RGS-G α Interaktionsort (A-Site): Diese G Protein Ansicht der RGS4 Bindungsoberfläche zeigt eine die Zwischenräume füllende Darstellung von G α _i-Threonin182 am Ort des RGS4-G α _i-Kontakts. Die leichte Vertiefung, die diesen Rückstand umgibt, könnte ein primäres strukturelles Ziel für noch zu entwickelnde kleinmolekulige RGS-Inhibitoren sein. Rot = negative Ladung; Blau = positive Ladung; Weiß = nicht geladen, adaptiert von der Kristallstruktur von Tesmer et al. 1997.

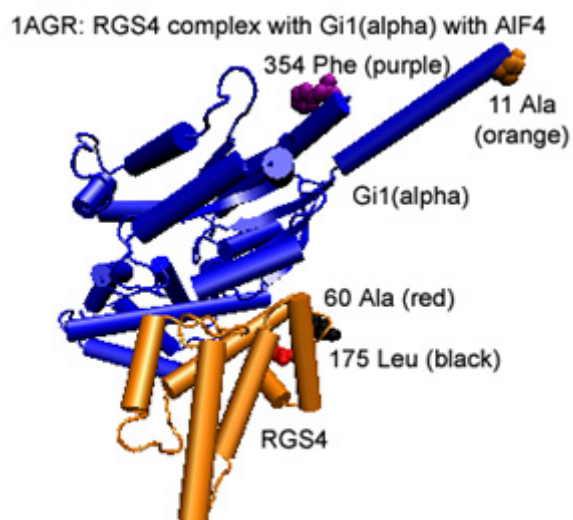


Abb.8: G α _i mit AIF4 im Komplex mit RGS4, adaptiert von der Kristallstruktur von Humphrey et al. 1996.

2.2.5 Funktion von RGS4

RGS4 ist stark im Neokortex exprimiert. Neurone koexprimieren viele verschiedene G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) und die Rezeptor-Signalübertragung ist an multiple G α Proteine gekoppelt. RGS4 ist an dem Konvergenzpunkt von mehreren G α _i-, G α _o- und G α _q-gekoppelten Signaltransduktionswegen situiert und reguliert die

Aktivität verschiedener Neurotransmittersysteme (Popov et al. 2000; Cavalli et al. 2000; Xu et al. 1999; Greengard et al. 1999),

Die G-Proteine besetzen eine Schlüsselposition in der Signaltransduktion, dabei inhibiert G_i die Bildung von Adenylcyclase und cAMP, öffnet die Kaliumkanäle und hemmt die Kalziumkanäle. G_{olf} dagegen aktiviert die Bildung von Adenylcyclase und cAMP und bindet an olfaktorische Rezeptoren. G_q stimuliert die Bildung von Phospholipase C und spielt bei der Kontraktion glatter Muskulatur und der Erregungsweiterleitung eine Rolle.

RGS4 reguliert, indem es dämpfend auf Agonisten von G-Protein gekoppelten Rezeptoren wirkt. Seine Funktion scheint selektiv auf bestimmte neurale Systeme ausgerichtet zu sein. So ist es z. B. in die Modulation der Funktion von Dopamin-Serotonin- und Glutamat-Rezeptoren involviert (De Vries et al. 2000).

Im Einzelnen verkürzt es die Signalübertragung, indem es die GTPase-Aktivität von G Protein Alpha Untereinheiten erhöht und sie dabei in ihre inaktive GDP-gebundene Form überführt. Die Aktivität von $G_{i\alpha}$, das ebenfalls bei der Hemmung der Adenylcyclase mitwirkt und $G_{i\alpha_1}$, das auch inhibierend auf die Bildung von Adenylcyclase wirkt, wird durch die Palmylierung des G-Proteins gehemmt.

Da angenommen wird, dass eine Überaktivität der Dopamin- und Serotonin-Rezeptoren in der Schizophrenie eine Rolle spielen, erscheint die postulierte Relation von RGS4 zur Pathogenese der Schizophrenie plausibel, denn reduzierte RGS4-Expression würde die Signalübertragung verlängern und damit einen veränderten Glutamat- bzw. Dopaminstatus bewirken. Abbildung 9 zeigt RGS4 und andere Schizophrenie-Suszeptibilitätsgene in einem hypothetischen Szenario nach Harrison und Owen (2003).

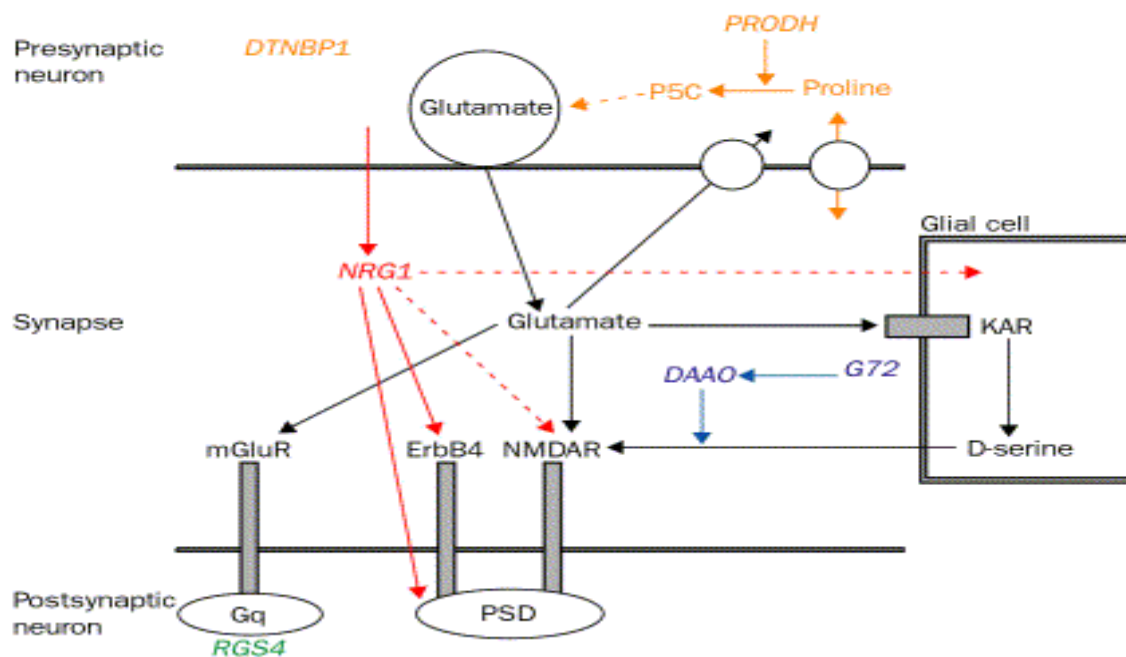


Abb.9: Schizophrenie-Suszeptibilitätsgene und hypothetisches plastisches Synapsenszenario. Dargestellt sind potentielle Interaktionen und Signaltransduktionsmechanismen an der Synapse, in die die entsprechenden Genprodukte (kursiv) involviert sein könnten. Es werden nur die glutamergen Synapsen gezeigt, aber GABAerge, cholinerge und monoaminerge Synapsen sind wahrscheinlich auch beteiligt. (durchgezogene Linien = direkte Interaktionen, gestrichelte Linien = indirekte Interaktionen, G_q = Subtyp des GTP-Bindungsproteins, KAR = Kainatrezeptor, mGluR = metabotroper Glutamatrezeptor, NMDAR = N-Methyl-D-Aspartatrezeptor, P5C = Pyrrolin-5-Carboxylat, PSD = Postsynaptische Densitätsproteine (Harrison und Owen 2003).

2.2.6 Expression von RGS4

RGS4 kommt im ganzen Körper vor. Es ist von allen neunzehn menschlichen RGS-Transkripten am stärksten im Gehirn exprimiert (Tabelle 3 und 4).

Tab 3: Die Expression von RGS4 im Körper (an 10 von 38 Orten) in % :

coronary artery	20.74
Hippocampus	17.53
Amygdala	16.86
Cerebrum	15.82
caudate nucleus	4.93
whole brain	4.27
corpus callosum	3.94
thyroid	3.41
cerebellum	1.88
peripheral_nervous_system	1.71

Quelle: (<http://harvester.embl.de/harvester/p497/p49798.htm>, 2005)

Tab 4: RGS4 Verteilung innerhalb der Zelle in %:

Nukleus	39,1
Zytoplasma	30,4
Mitochondrien	17,4
Zytoskelett	13,0

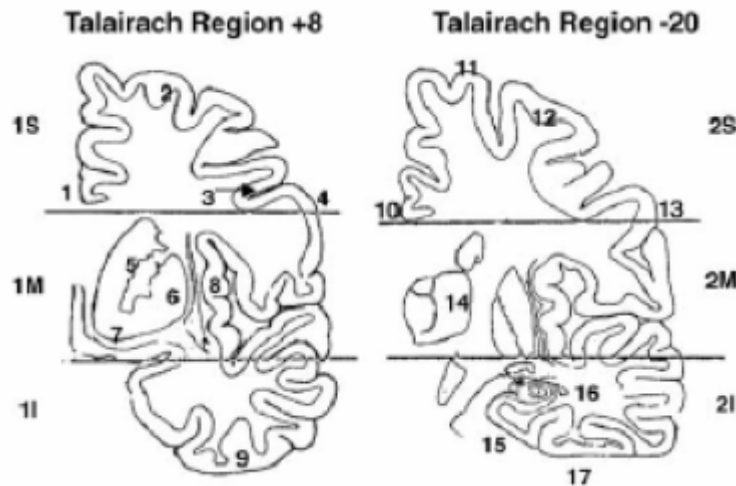
Quelle: (<http://harvester.embl.de/harvester/p497/p49798.htm>, 2005)

Vorkommen von RGS4 im gesunden menschlichen Gehirn

Die für die Aufklärung über Vorkommen und Funktion von RGS4 bedeutsame Studie von Erdely et al. (2004) präsentiert eine ausführliche Untersuchung der regionalen Verteilung von RGS4 mRNA in *post mortem* Hirnen gesunder Personen. Bis dato wurden die meisten Experimente an nichtmenschlichem Gewebe vorgenommen und deshalb war wenig über die normale RGS4 Verteilung im Gehirn gesunder Menschen bekannt.

Unter Anwendung der *in situ* Hybridisierung wurden exprimierte Mengen an RGS4 mRNA in menschlichen hemikoronalen (Talairach Sektionen +8 und -20) Gehirnsektionen bestimmt.

Abbildung 10 zeigt die untersuchten Gehirnsektionen mit den entsprechenden bedeutenden Regionen. *Post mortem* Gewebe gesunder Personen im Alter von durchschnittlich 42 Jahren aus der Maryland Hirnbank wurde untersucht. Es wurde darauf geachtet, dass die Personen relativ jung waren und das *post mortem* Intervall bis zum Einfrieren kurz war.



Talairach Region +8 Nummer Region		Talairach Region -20 Nummer Region	
1	Gyrus cinguli	10	Gyrus cinguli
2	Superiorer frontaler Gyrus	11	Superiorer frontaler Gyrus
3	Inferiorer frontaler Sulcus	12	Posteriorer zentraler Gyrus
4	Inferiorer frontaler Gyrus	13	Inferiorer frontaler Gyrus
5	Caudatum	14	Thalamus
6	Putamen	15	Parahippocampaler Gyrus
7	Nukleus Accumbens	16	Hippocampus, cornu ammonis pyramidalis
8	Lobus insularis	17	Inferiorer temporaler Gyrus
9	Inferiorer temporaler Gyrus		

Abb.10: Das Diagramm zeigt die untersuchten Gehirnsektionen mit den korrespondierenden interessanten Gebieten. Hemikoronale Gewebsblöcke wurden ungefähr 1,5 cm dick geschnitten, einer auf dem Niveau des kaudaten Hippocampus (Talairach Region +8, links), der andere ungefähr 2 cm posterior auf dem Niveau des mittelanterioren Hippocampus (Talairach Region -20, rechts). Jeder Halblock wurde dann weiter in drei transversale Sektionen aufgeteilt: Superior (S), Mitte (M), Inferior (I). Die analysierten Areale sind nummeriert und die identifizierten Regionen sind unten mit den korrespondierenden Nummern aufgeführt (Erdely et al. 2004).

Die RGS4 mRNA war ausgesprochen stark in den meisten untersuchten kortikalen Schichten exprimiert und in geringerem Umfang in den Basalganglien und im Thalamus. Eine Zusammenfassung aller analysierten Regionen zeigt Abbildung 11. Im Talairach +8 Schnitt wurde die höchste Menge an RGS4 im inferioren Frontalkortex, superioren Frontalkortex und Kortex cinguli gefunden, gefolgt von Lobus insularis und inferiorem Temporalkortex. Bei der Talairach -20 Region wiesen die kortikalen Schichten die höchste Dichte auf. Die ausgeprägte Dichte der RGS4 Expression in kortikalen Regionen mag darauf hinweisen, dass RGS4 beim Menschen eine wichtigere Rolle bei der Regulierung der Dopaminrezeptor- Funktion im Kortex spielt als in anderen Regionen.

Neuere Studien haben jedoch gezeigt, dass RGS4 auch mit anderen Neurotransmitter-Systemen, wie metabotropen Glutamat Rezeptoren (Saugstad et al. 1998) und Muskarin-Rezeptoren (Cladman und Chidiac 2002) interagiert.

Die Information über die hier dargestellte örtliche Verteilung von RGS4 mRNA – Expression kann als Hintergrundinformation bei Vergleichen von Gewebeteilen verschiedener Gehirnerkrankungen, wie z.B. Schizophrenie, dienen.

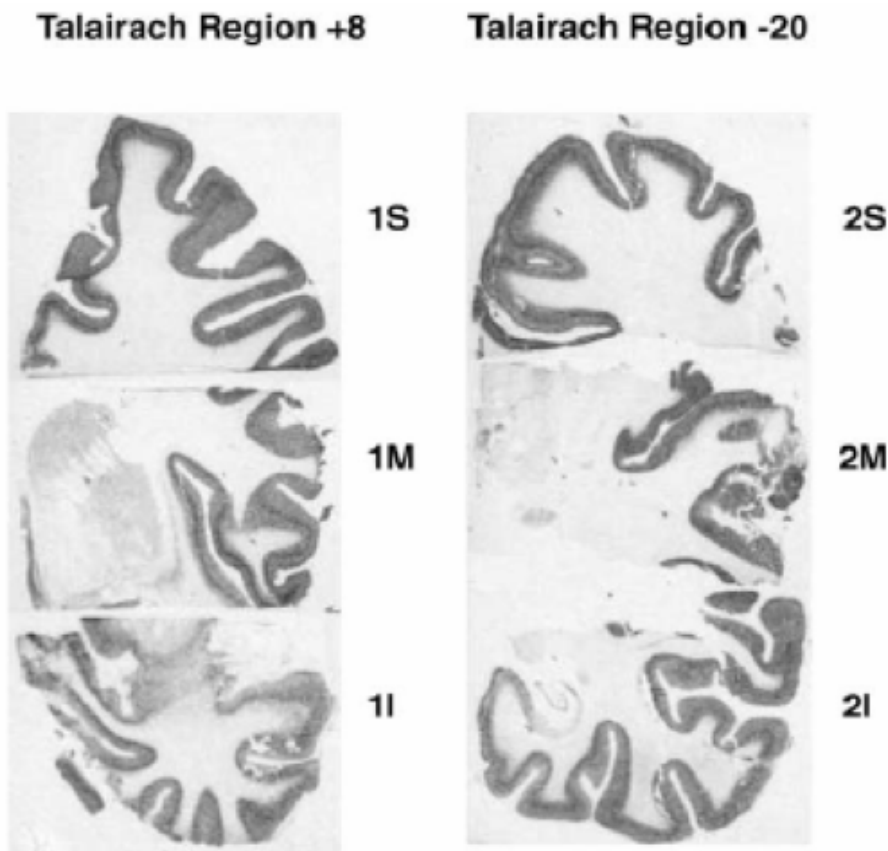


Abb.11: Hellfeld-Photomikrographien der Filmautoradiogramme von RGS4 mRNA Hybridisierungen. Sie zeigen das Markierungsmuster der RGS4 mRNA-Expression in gesunden menschlichen *post mortem* Gehirnsektionen. Im rostralen Schnitt (Talairach +8) wurde der höchste Markierungsgrad in inferiorem frontalen und superiorem frontalen Kortex ermittelt. Etwas niedrigere Markierung wurde im Lobus insularis und inferioren temporalen Kortex gefunden. Corpus striatum mit Putamen, Nucleus lentiformis und Nucleus caudatus zeigten weniger Markierung. In dem caudalen Schnitt (-20) zeigten die kortikalen Schichten die stärkste Expression. Moderate Markierung wies der parahippocampale Gyrus, niedrige Markierung die CA-pyramidale Region auf. Fast nicht nachweisbar war eine Expression im Thalamus. Im frontalen Kortex war ein dichtes Band nahe einer der inneren Lagen des Kortex zu sehen. Fazit: Die RGS4 mRNA Verteilung in menschlichem *post mortem* Gewebe gesunder Personen ist sehr dicht in den meisten der untersuchten Kortexschichten, mit geringerer Dichte im Striatum und Thalamus (Erdely et al. 2004).

2.2.7 RGS4 und Schizophrenie

Krankheitsspezifische Veränderungen der RGS4 Expression bei der Schizophrenie

Die bedeutsamste Studie zu krankheitsspezifischen Veränderungen der RGS4 Expression im Gehirn von Schizophreniepatienten wurde von Mirnics et al. (2001) durchgeführt.

Mirnics et al. fanden heraus, dass die Expression von RGS4 mRNA in *post mortem* Hirnen schizophrener Patienten signifikant erniedrigt ist.

Ihre cDNA–Microarray Untersuchung ergab, dass die Expression von RGS4 im präfrontalen Kortex aller untersuchten schizophrenen Patienten um 34 % reduziert war (Abb. 12 a und b). Die mRNA Expression von 10 anderen RGS Proteinen und insgesamt 274 Genen, die mit G-Protein Signaling assoziiert werden, war dagegen unverändert. *In-situ* Hybridisierung wurde verwendet, um die Mikroarray-Ergebnisse zu bestätigen. Auch sollte die regionale und mit der Krankheit in Zusammenhang stehende Spezifität dieser Veränderung untersucht werden, denn RGS4 befindet sich in unmittelbarer Nähe zu 1q21-22, einer chromosomalen Region, die eine Kopplung zu Schizophrenie aufweist (Brzustowicz et al. 2000) und deshalb einen potentiellen Kandidaten für ein Schizophrenie-Suszeptibilitäts-gen darstellt.

In drei kortikalen Gebieten von zehn schizophrenen Patienten bestätigte die quantitative *in situ* Hybridisierung die Mikroarray-Daten und zeigte eine verminderte RGS4- Expression.

Die RGS4 Expression im präfrontalen Kortex war unverändert bei Patienten mit Depression (MDD = Major Depressive Disorder, Abbildung 12 c) oder bei Cynomolgus Affen, die über einen längeren Zeitraum mit Haloperidol behandelt wurden (Mirnics et al 2001). Daraus wird ersichtlich, dass die verringerte Expression des kortikalen RGS4 Transkripts nicht mit allen psychiatrischen Störungen assoziiert ist. Zudem scheint die erniedrigte Expression keine Folge einer Antipsychotischen Behandlung zu sein.

Die Daten deuten darauf hin, dass die Verringerung der RGS4-Expression ein Merkmal der Schizophrenie aufgrund genetischer Faktoren oder krankheitsspezifischer Adaptation sein könnte, wobei beide die neuronale Signalübertragung beeinflussen könnten.

Vorhergehende Studien haben gezeigt, dass signifikanter Zellverlust im Kortex schizophrener Patienten nicht auftritt (Pakkenberg 1993, Thune et al. 2000). Auch ist die Verringerung der RGS4-Expression unabhängig von Alkoholmissbrauch (Mirnics et al. 2001).

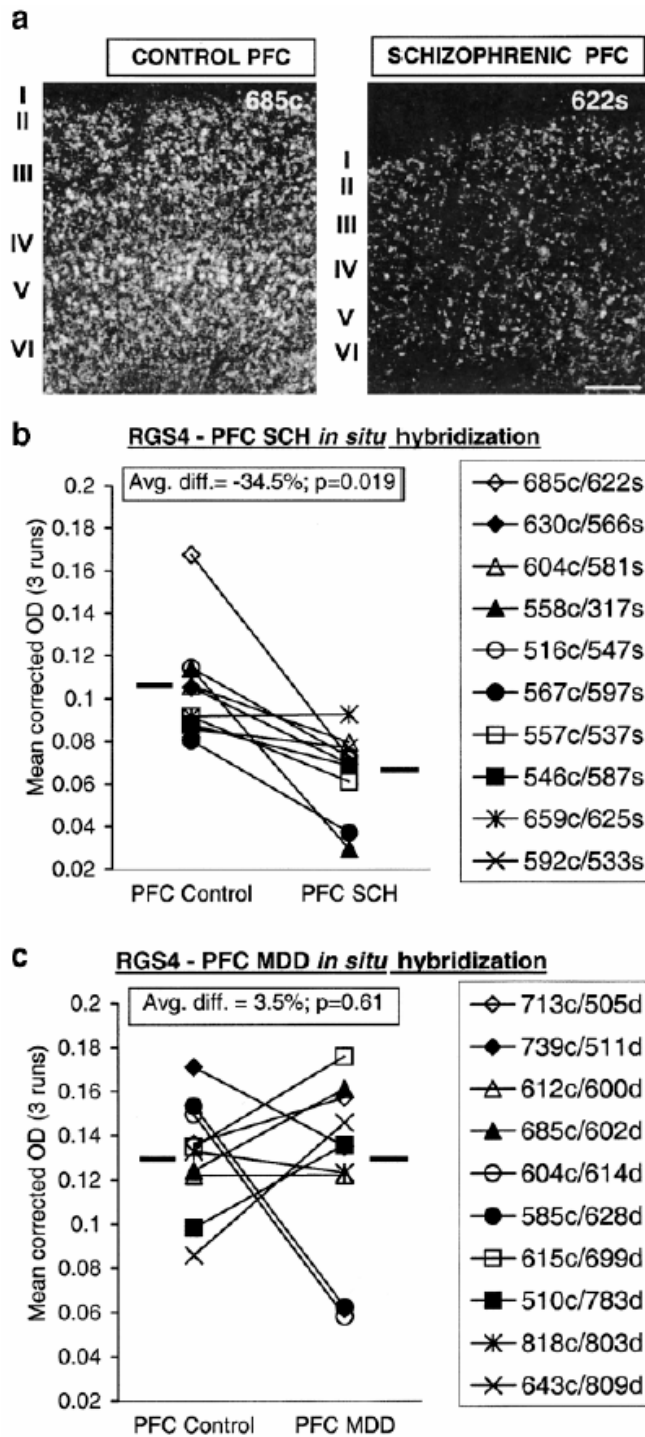


Abb.12: RGS4 Expression im präfrontalen Kortex ist bei neun von zehn Schizophreniepatienten (Sch) verringert, aber nicht bei Patienten mit Major Depressive Disorder (MDD).

a) In Emulsion getauchte *in situ* Hybridisierungs-Mikrographien von präfrontalen Kortexgewebeschnitten eines Schizophreniepatienten (622s) und der passenden Kontrolle (685c) wurden in Dunkelfeldbeleuchtung dargestellt. Lateinische Zahlen bezeichnen die kortikalen Schichten. Bemerkenswert ist die über alle Schichten verminderte Markierung beim Schizophreniepatienten. Die weiße Substanz weist keine Markierung auf. Maßstab = 400 μ (Mirnics et al. 2001).

b) Die *in situ* Hybridisierungsdaten von zehn paarweisen Vergleichen des präfrontalen Kortex wurden mittels Filmdensitometrie quantifiziert. Die x-Achse repräsentiert Patienten bzw. Kontrollen, die y-Achse zeigt die durchschnittliche optische Filmdichte von drei wiederholten Hybridisierungen, gemessen wurde in allen Schichten. Die Linien, die Symbole verbinden, stellen jeweils ein Patient-Kontrollpaar dar. Die Querstriche zeigen die Gruppenmittelwerte. Beachtenswert ist, dass bei zehn paarweisen Vergleichen neun Schizophreniepatienten eine Reduzierung des RGS4-Transkripts aufwiesen (durchschnittlich = - 34 %; $F_{1,15} = 6.95$; $P = 0.019$)

c) Die MDD Patienten und die dazugehörigen Kontrollen zeigen vergleichbare RGS4 Anreicherung (durchschnittlich = + 3,5 %; $F_{1,15} = 0,27$; $P = 0,61$) (Mirnics et al. 2001).

Außer im präfrontalen Kortex ist die RGS4 Transkription auch signifikant um 33 % im visuellen Kortex (Abbildung 13) und um 34 % im motorischen Kortex (Abbildung 14) reduziert.

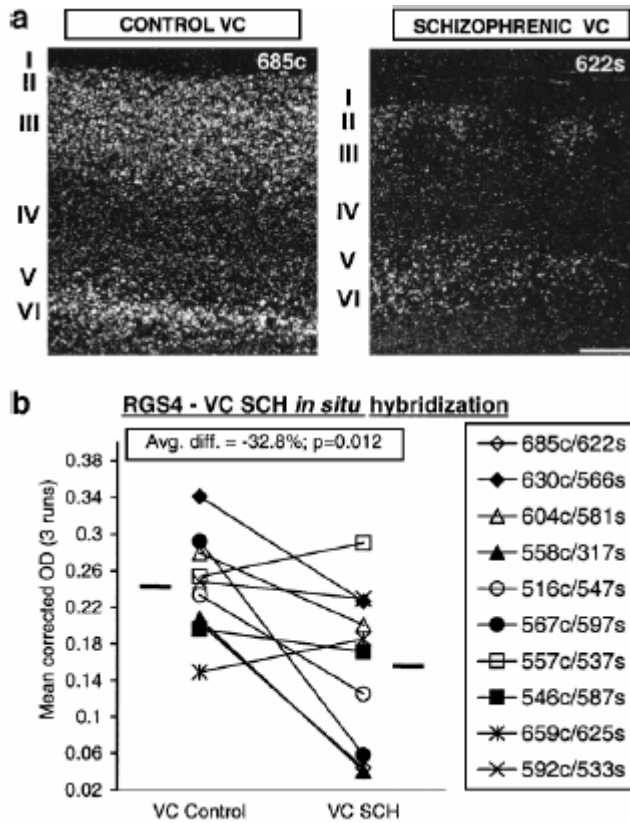


Abb.13: Die RGS4 Expression ist signifikant verringert im visuellen Kortex von Schizophreniepatienten. Diagrammaufbau ist wie in Abb.11.

a) Abgebildet sind *in situ* Hybridisierungs-Mikrographien von Schnitten des visuellen Kortexgewebes derselben Schizophrenie- und Kontrollpaare wie in Abb.11. Der Maßstab ist ebenfalls = 400µ. Die schwache Markierung gehört zu Schicht IV, die im visuellen Kortex ausgedehnt ist.

b) In zehn paarweisen Vergleichen zeigen die schizophrenen Patienten auch eine signifikante Reduzierung der RGS4 Expression (durchschnittlich = - 32,8 %; $F_{1,15} = 8,24$; $P = 0,012$) (Mirnics et al. 2001) im visuellen Kortex.

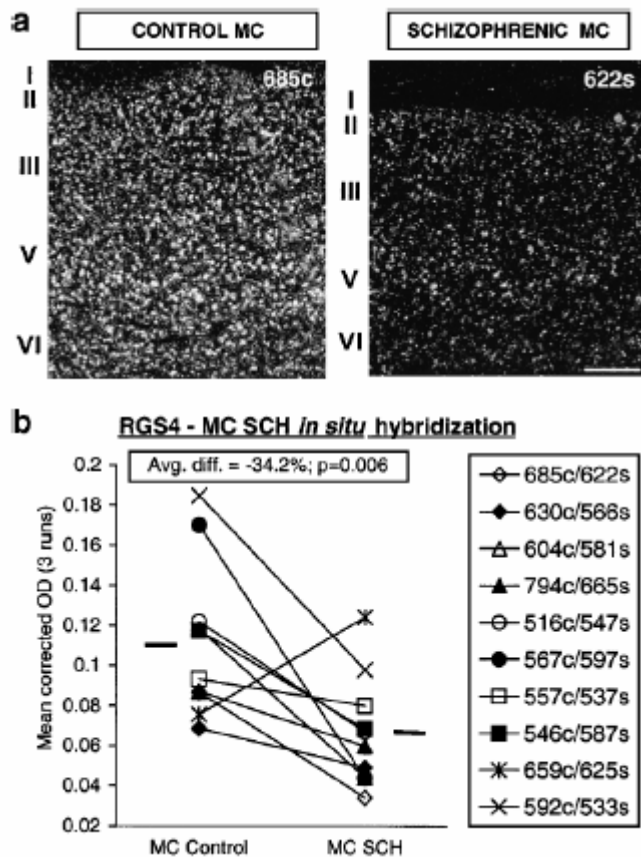


Abb.14: Die RGS4 Expression ist signifikant verringert im motorischen Kortex von Schizophreniepatienten. Diagrammaufbau ist wie in Abbildung 11.

a) Abgebildet sind *in situ* Hybridisierungs-Mikrographien von Schnitten des motorischen Kortexgewebes derselben Schizophrenie- und Kontrollpaare wie in Abb.11. Der Maßstab ist ebenfalls = 400µ. Weil Schicht IV im motorischen Kortex weniger ausgeprägt ist, stellt sich die RGS4 Markierung in allen Schichten ziemlich einheitlich dar.

b) In zehn paarweisen Vergleichen zeigen die schizophrenen Patienten auch eine signifikante Reduzierung der RGS4 Expression (durchschnittlich = - 34,2 %; $F_{1, 15} = 10,18$; $P = 0,006$) (Mirnics et al. 2001) im motorischen Kortex.

Die Mikroarray-Untersuchung von Mirnics et al. zeigte konsistente Veränderung der RGS4 mRNA-Expression im Kortex. Außerdem demonstrierte sie, dass die Transkription anderer RGS- oder G-Protein Signaling-Komponenten im Kortex der Schizophreniepatienten im Vergleich zu Kontrollen unverändert ist.

Unter Berücksichtigung der Rolle von RGS4, die Signalübertragung in der G-Protein Kaskade zu regulieren, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Schizophreniepatienten Veränderungen der synaptischen Signaltransduktion in verschiedenen Gehirnbereichen aufweisen könnten.

Während es wahrscheinlich ist, dass die starken Veränderungen in der RGS4-Expression einen veränderten funktionalen Status reflektieren, müssen direkte Analyse von Proteinmenge und –Aktivität noch erfolgen.

RGS4 befindet sich an dem Konvergenzpunkt von vielen G_i , G_{olf} und G_q -gekoppelten Signalpfaden und reguliert möglicherweise die Aktivität von

verschiedenen Neurotransmittersystemen (Popov et al. 2000; Cavalli et al. 2000; Xu et al. 1999; Greengard et al. 1999).

Der Effekt des RGS4-Mangels auf spezifische neurale Kreise wird abhängen von der Balance zwischen den hemmenden und erregenden Signalen.

Die bekannten pharmakologischen Effekte von Antipsychotika (APD = Antipsychotic Drug) stimmen überein mit der Funktion von RGS4 als Regulator der durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) vermittelten Signalübertragung im Neokortex und mit der D2-Rezeptor-Überaktivität (Abi-Dargham et al. 2000). Typische Antipsychotika, einschließlich Haloperidol, sind potente und relativ selektive Antagonisten für Gi-gekoppelte D2- Rezeptoren (Missale et al. 1998, Creese et al. 1976, Stockmeier et al. 1993, Seeman et al. 1999).

Atypische Antipsychotika (z.B. Clozapin, Olanzapin, Risperidon) haben zusätzlich zur D2-Rezeptorbindung antagonistische Effekte auf verschiedene Neurotransmitter-Rezeptoren. Daraus resultiert, dass atypische Antipsychotika Gi- und Gq-abhängige Signalübertragung in einem viel weiteren neuronalen Pool hemmen, als typische Antipsychotika.

Mirnics et al. postulieren, dass die Blockade von multiplen G-Protein gekoppelten Rezeptoren die reduzierte Fähigkeit von RGS4, als GTPase aktivierendes Protein (GAP) in der Schizophrenie zu agieren, kompensieren könnte und so mögliche hyperaktive Gi-Gq-vermittelte Signalübertragung hemmen könnte.

Zusammenfassend kommen Mirnics et al. zu dem Schluss, dass die Konsistenz ihrer Ergebnisse daraufhin deutet, dass Defizite der RGS4-Expression direkt mit Symptomen der Schizophrenie verknüpft sein könnten und dieser Befund damit ein neues und viel versprechendes Ziel für therapeutische Intervention darstellt.

Assoziations- und Kopplungsstudie von RGS4 Polymorphismen bei Schizophrenie

In einer ersten Assoziations- und Kopplungsstudie befassten sich Chowdari et al. (2002) mit RGS4-Polymorphismen von Schizophreniepatienten aus Pittsburgh, NIMH Collaborative Genetics und Neu Delhi mit insgesamt 1400 Personen. Sie untersuchten 4 von 13 SNPs, die innerhalb einer genomischen Region von 300 kb im RGS4-Gen lokalisiert sind.

Signifikante Assoziation zwischen RGS4 und Schizophrenie wurde in den beiden amerikanischen Kollektiven gefunden, wobei die Ergebnisse der verschiedenen SNPs und Haplotypen differierten. Bei den indischen Proben konnte keine signifikante Assoziation, sondern nur ein Trend festgestellt werden. Die Assoziation betraf vier, auch als Kern-SNPs bezeichnete, SNPs 1, 4, 7 und 18, die in einer 10 kb Region des RGS4 Gens lokalisiert sind und einem daraus gebildeten Haplotyp SNP 1, 4, 7 und 18 (Tabelle 22).

Bestätigung von RGS4 als Suszeptibilitätsgen für Schizophrenie

In einer Folgestudie versuchten Morris et al. (2003) die Ergebnisse von Chowdari et al. zu replizieren. An einer Irischen Population mit 279 Patienten konnten sie eine Assoziation von Schizophrenie mit dem RGS4 Gen nachweisen. Die Assoziation betraf den gleichen Viermarker-Haplotyp, der von Chowdari et al. untersucht worden ist und zwei Einzel-Nukleotid-Polymorphismen SNP 1 und 7 (Tabelle 22).

Weiterer Hinweis darauf, dass RGS4 als Suszeptibilitätsgen für Schizophrenie in Frage kommt

Williams et al. (2004) untersuchten in einer weiteren umfangreichen Studie mit 709 Schizophreniepatienten und 710 Kontrollen aus Großbritannien und Irland die mögliche Assoziation von RGS4 mit der Schizophrenie.

Für die Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) 4 und 18 und den Haplotypen aus den SNPs 1 und 4 wurde eine signifikante Assoziation gefunden. Die Daten von Williams et al. unterstützen ebenfalls die Hypothese, dass RGS4 ein Suszeptibilitätsgen für Schizophrenie darstellt (Tabelle 22).

Assoziation von RGS4-Polymorphismen und Schizophrenie: Interaktion mit dem Geschlecht

In einer explorativen Studie untersuchten Talkowski et al. (2003) klinische Subgruppen, um die divergierenden Ergebnisse der vorhergehenden Arbeit von Chowdari et al. aufzuhellen. Sie stellten fest, dass bei Frauen mit dem RGS4-SNP 1

Genotyp GG das Alter, in dem Schizophrenie zu ersten Mal auftritt, signifikant reduziert ist (Tabelle 22).

Das RGS4 Gen ist in irischen High-Density Familien mit Schizophrenie assoziiert

Die bis jetzt letzte Untersuchung auf diesem Gebiet führten Chen et al. (2004) an einer irischen Population mit 1400 Probanden durch. Die Studie zeigt eine moderate Assoziation für SNP 18 und einen Trend für SNP 4. Die Haplotyp-Analyse deutet darauf hin, dass der mit 42 % in irischen Familien am weitesten verbreitete Haplotyp G-G-G von SNP 1-4-18 mit Schizophrenie assoziiert ist. Auch hier handelt es sich um denselben Haplotyp, den Chowdari et al. identifizierten (Tabelle 22).

Genetische RGS4-Polymorphismen und dorsolaterale präfrontale Kortex-Morphometrie bei erkrankten Schizophreniepatienten

Die fünf erwähnten Genkopplungs- und Assoziationsstudien bezüglich RGS4 und Schizophrenie wurden kürzlich ergänzt durch eine Assoziationsstudie, die den Zusammenhang von dorsolateraler präfrontaler Kortexmorphometrie und RGS4 untersucht.

Prasad et al. (2004) wählten dafür ein junges (Durchschnittsalter = 25 a) Patientenkollektiv (n = 30) europäisch-amerikanischer Abstammung aus Pittsburgh mit Schizophrenie bzw. schizoaffektiver Störung. Sie quantifizierten das dorsolaterale präfrontale Kortex-(DLPFC) und das intrakraniale Volumen mittels MRI-Scans. Die Assoziation der SNPs 1, 4, 7 und 18 mit den unterschiedlichen DLPFC-Volumina wurde ermittelt.

Beim linken DLPFC ergab sich eine signifikante Assoziation für die SNPs 4 und 18, beim rechten DLPFC für die SNPs 1, 4 und 18 mit einer Volumenreduktion von durchschnittlich 25 %.

Prasad et al. fanden also heraus, dass bei Schizophreniepatienten RGS4-Polymorphismen mit dem DLPFC-Volumen korrelieren. Da es sich um junge Patienten handelte, ist der Effekt weder auf die Chronizität der Krankheit noch auf die Behandlung mit antipsychotischen Medikamenten, die ja bekannterweise das Gehirnvolumen verändern, zurückzuführen.

3 Fragestellung

Es gilt heute als gesichert, dass eine starke genetische Komponente in der Ätiologie der Schizophrenie vorliegt. Die Entstehung schizophrener Erkrankungen ist jedoch noch nicht geklärt. Fall-Kontroll-Assoziationsstudien sind eine empfindliche Methode, um auf molekulargenetischer Ebene nach Suszeptibilitätsgenen mit kleinen Effekten bei komplexen Krankheiten wie der Schizophrenie zu suchen.

RGS4 wurde im Literaturüberblick als interessantes Kandidatengen der Schizophrenie ausgewiesen. Es liegt auf Chromosom 1 in der Region, die in genomweiten Kopplungsstudien starke Kopplung mit Schizophrenie zeigt. In zwei primären Referenzstudien (Mirnics et al. 2001, Chowdari et al. 2002) wurden einerseits eine signifikante Veränderung der kortikalen RGS4 Expression bei Schizophreniepatienten und andererseits eine signifikante Assoziation mit Schizophrenie für die in dieser Arbeit untersuchten Einzel-Nukleotid-Polymorphismen beschrieben.

Ziel der vorliegenden Studie ist es, Zusammenhänge zwischen den untersuchten Polymorphismen des RGS4-Gens mit Schizophrenie an einer deutschen Population zu erfassen. Dazu wurden Allel- und Genotypfrequenzen von schizophrenen Patienten mit einer gesunden Kontrollpopulation verglichen.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Tab 5: Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Inkubator	IR-1500	Flow Laboratories, Virginia, USA
Waagen	Explorer	Ohaus Corporation, USA
	PRECISA 1620 C	PRECISA Instruments AG, Dietikon
Zentrifuge	Centrifuge 5804	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Hamburg
Zentrifugenröhrchen	PP-Röhrchen steril	Greiner Labortechnik
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5415 C	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Hamburg
Thermocycler	Mastercycler gradient	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Hamburg
	Mastercycler	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Hamburg
Tiefkühlschrank	Economic (-20 °C)	Bosch, München
Ultra-Tiefkühlschrank	ULT 1386 VOE (-80 °C)	REVCO Scientific Inc., Asheville, USA
Pipetten		Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Hamburg
Pipettenspitzen		Sarstedt, Nümbrecht
Gelkammer	Wide Mini Sub Cell GT, Agarose Gel Electrophoresis Systems	Bio Rad Laboratories GmbH, München
Spannungsquelle	Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Eagle Eye	Eagle Eye II Photosystem	Stratagene, La Jolla, USA
Photometer	Genequant	Pharmacia Biotech
Wasserbad	WB 14	Memmert GmbH u. CoKG, Schwabhausen
Mikrowelle	Privileg 9024 E	Privileg
Vortexer	Reax	Heidolph

4.1.2 Software

Tab 6: Software

Software	Typ	Hersteller
Statistiksoftware	SPSS 11.0	Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, 2001
Bildverarbeitungssoftware	Photoshop 6.0	Adobe, USA

4.1.3 Chemikalien

Tab 7: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ethanol absolut	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
QIAamp DNA Blood Maxi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany
Streptokinase	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany
H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
dNTP 10 mM	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Primer	Fa. Life Technologies, Karlsruhe
5 x PCR-Puffer:	Fa. Invitrogen, San Diego, USA
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (rekombinant) 1 U / μ l	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
10 x NEB-Puffer 4	New England Biolabs, Frankfurt
5 x TBE-Puffer:	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris-hydroxymethyl-aminomethan	
Borsäure	
EDTA-Dinatriumsalzdihydrat	
Ethidiumbromid Solution 10 mg /ml	Bio Rad Laboratories GmbH, München
DNA-Leiter 100 bp, 0,5 mg DNA /ml	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
6 x Ladepuffer:	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bromphenolblau	
30 % Glycerol	
EDTA-Lösung (0,5 M)	

4.1.4 Polymorphismen

Tab 8: Polymorphismen

Gen	dbSNP ID ^a	SNP	Allel	Funktion
RGS4	Rs951436	SNP4	T/G	Promoter
RGS4	Rs951439	SNP7	G/A	Promoter
RGS4	Rs2661319	SNP18	A/G	Intron 1

4.2 Methoden

4.2.1 Studienteilnehmer - Kontrollgruppe

Als Studienteilnehmer haben wir eine Gruppe von 184 nicht verwandten, gesunden, per Zufallsauswahl aus der allgemeinen Bevölkerung Münchens ausgewählten Freiwilligen untersucht. Ihr Alter lag im Durchschnitt bei 47 Jahren (Tabelle 9). Sie wurden per Post kontaktiert. Um eigene neuropsychiatrische Störungen oder solche bei Verwandten ersten Grades auszuschließen, wurden vor Studieneinschluss mehrere Untersuchungen durchgeführt wie ein Telefonscreening sowie die Erfassung einer schriftlichen medizinischen und psychiatrischen Anamnese und jene ihrer Verwandten ersten Grades. Als nächstes wurden sie zu einem umfassenden Interview eingeladen, das das Strukturierte Klinische Interview (SKID) für DSM-IV (SKID I und SKID II) einschloss (First et al. 1997; Wittchen et al. 1997). Psychiatrische Diagnosen unter Verwandten ersten Grades wurden mit Hilfe des Family History Assessment Modules (Rice et al. 1995) beurteilt. Testpersonen mit relevanten somatischen Krankheiten oder Achse I/II-Störungen (lifetime) wurden ausgeschlossen. Ebenso erfolgte ein Ausschluss bei positiver psychiatrischer Familienanamnese.

4.2.2 Studienteilnehmer - Schizophrene Patienten

Wir untersuchten eine Gruppe von schizophrenen Patienten (n = 184) bestehend aus männlichen und weiblichen kaukasischen Patienten mit Schizophrenie entsprechend den DSM-IV-Kriterien. Die Patienten waren im Durchschnitt 38 Jahre alt (Tabelle 9). Besondere Sorgfalt wurde darauf verwendet, Patienten mit somatischen Krankheiten auszuschließen, welche psychotische Symptome verursachen könnten, wie zum

Beispiel kürzlicher Drogenmissbrauch.

Tab 9: Beschreibung der Kontroll- und Patientengruppe nach Alter und Geschlecht

Gruppe	Alter Jahre Mittelwert (SD)	Geschlecht n%		Gesamt (n)
		Männlich	Weiblich	
Kontrollen	47 (13)	87 (47,3)	97 (52,7)	184
Patienten	38 (12)	110 (59,8)	74 (40,2)	184
Gesamt n (%)		197 (53,5)	171 (46,5)	368

4.2.3 Zellkultur

Bei der in dieser Arbeit angewandten Zellkulturmethode wurde Blut von Schizophreniepatienten und Kontrollen abgenommen und ihre B-Lymphozyten unter zu Hilfenahme des Epstein-Barr-Virus vermehrt. Anschließend wurde die DNA daraus extrahiert.

Immortalisierung mit dem Epstein-Barr-Virus

Verwendet wurde das Epstein-Barr-Virus (EBV), weil es B-Lymphozyten effizient infiziert und immortalisiert. EBV gehört zur Gruppe der humanen Herpes-ähnlichen DNA-Viren, die für Drüsenfieber und die infektiöse Mononukleose verantwortlich sind. Ihm selbst schreibt man eine Rolle bei der Entstehung von Nasopharynxcarcinomen und dem afrikanischen Burkitt-Lymphom zu. EBV muss sich nicht in das Genom der Wirtszelle integrieren, um sie zu immortalisieren. Die Expression der EBV-Gene führt dazu, dass die Zelle aus der G-Phase wieder in den Zellzyklus eintritt und beginnt, sich zu teilen. EBV hat die besondere Eigenschaft, dass sich in seinem Genom bestimmte Sequenzen befinden, die es ihm erlauben, sich extrachromosomal zu replizieren. Durch diesen Prozess wird die Virus-DNA bei der Zellteilung auch dann weitergegeben, wenn sie nicht ins Wirtszellgenom integriert ist. Die Festlegung des Virus auf ganz spezielle Zelltypen hängt nicht mit seiner immortalisierenden Wirkung zusammen, sondern mit seiner Infektionsweise. Die Infektion ist vom menschlichen Komplementrezeptor (CR2) abhängig, der sich nur auf B-Lymphozyten und einigen antigen-präsentierenden Zellen befindet. Deshalb lassen sich B-Zellen selektiv immortalisieren, klonieren und

kryokonservieren, so dass man sie zu einem späteren Zeitpunkt als lebensfähiges Material wieder auftauen kann.

Obwohl infektiöse Partikel dieses Virus von den meisten gesunden Menschen isoliert werden können, ohne dass diese irgendwelche Symptome zeigen, wurden sämtliche Arbeiten mit EBV in einer sterilen Arbeitsbank der Sicherheitsklasse II durchgeführt. Alle Abfälle, die mit Viren in Berührung gekommen sind, wurden autoklaviert. Das UV-Licht der Arbeitsbank wurde regelmäßig nach der Arbeit mit EBV eingeschaltet.

Vorbereitung des Epstein-Barr-Virus

Das Epstein-Barr-Virus wurde aus kultivierten Zelllinien isoliert. Der hierzu benutzte Stamm ist eine immortalisierte, virusproduzierende, lymphoblastoide Zelllinie aus dem Krallenaffen. Diese B95-8-Zellen setzen ständig infektiöse EBV-Partikel in das Kulturmedium frei. Die Zelllinie B95-8 wurde von der ECACC, einer Zelltypensammlung, bezogen.

Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium (Zellkultur-Bikarbonat-Puffer mit Aminosäuren und Vitaminen des Roswell Park Memorial Institutes) mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FKS) kultiviert und kryokonserviert. Nach einer Lagerung in flüssigem Stickstoff wurden sie aufgetaut und vor ihrem Gebrauch für 24 h kultiviert. Da die Zellen in Suspension wachsen und die Eigenart haben zu agglutinieren, wurden diese Aggregate durch vorsichtiges Aufziehen und Ausblasen mit der Pipette wieder aufgelöst. Sie wurden so subkultiviert, dass stets Zellkonzentrationen zwischen $2 \times 10^5/\text{ml}$ und $8 \times 10^5/\text{ml}$ vorlagen.

Die Zellen wurden so lange kultiviert, bis die Zelldichte etwa $1 \times 10^6/\text{ml}$ betrug. Diese hohe Zelldichte belastet die Zellen, so dass sie Virenpartikel in das verhältnismäßig kleine Volumen freisetzen. Als weiterer Stressfaktor wurde die Inkubation der Zellen bei Raumtemperatur für 24 h gewählt, eine unproblematische und effektive Stressmethode. Die Kulturflasche wurde dazu mit zugeschraubtem Deckel in aufrechter Position inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellen für 10 min. bei 400 g pelletiert.

Der Überstand wurde abgezogen und durch einen $0,45\mu\text{m}$ -Einmalsterilfilter filtriert, um eventuell darin verbliebene Zellen abzutrennen. Schließlich wurde dieser Überstand in 1-ml-Portionen in Gefrier Röhrchen eingefroren und bei -80°C gelagert.

Medien und Lösungen:

Medium I (Verdünnungslösung)	
RPMI 1640 (mit stabilem Glutamin)	500 ml
Gentamycin	5 ml
Natrium-Pyruvat	5ml

Medium II (Waschlösung)	
RPMI 1640 (mit stabilem Glutamin)	500 ml
Gentamycin	5 ml
Natrium-Pyruvat	5 ml
Fetales Kälberserum	50 ml

Medium III (Nährmedium)	
RPMI 1640 (mit stabilem Glutamin)	500 ml
Gentamycin	5ml
Natrium-Pyruvat	5 ml
Phytohaemagglutinin (PHA)	5 ml
Fetales Kälberserum	50 ml

Bei Natrium-Pyruvat und Gentamycin wurden die gebrauchsfertigen Lösungen verwendet. Sie lagerten zusammen mit Phytohaemagglutinin bei 4°C.

Fetales Kälberserum (FKS) lagerte bei -20°C. Es wurde langsam im Kühlschrank aufgetaut und im Wasserbad bei 56°C für 30 min hitzeinaktiviert, die Temperaturkontrolle erfolgte mittels einer Referenzflasche. Vor jedem Gebrauch wurde es auf Trübung geprüft.

Ficoll wurde bei Zimmertemperatur und dunkel gelagert, einige 15 ml Gefäße wurden als Vorrat abgefüllt.

Zellpräparation

7,5 ml Vollblut wurden 1:1 mit vorgewärmtem (37°C) Medium I verdünnt.

7,5 ml dieser Verdünnung wurden mit steriler Pipette auf 4ml Ficoll-Röhrchen langsam überschichtet und 40 min bei 1600 rpm zentrifugiert.

Der Lymphozytenring (weißlich abgesetzt zwischen Ficoll und Medium1) wurde vorsichtig mit steriler Transferpipette abgenommen und in einem 50 ml Gefäß

gesammelt. Er wurde mit vorgewärmtem (37°C) Medium II auf 50 ml aufgefüllt und 20 min bei 1400 rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde langsam abgekippt, das Zellpellet mit 10 ml vorgewärmtem (37°C) Nährmedium (Medium III) aufgeschwemmt und mit 1 Röhrchen EBV-Überstand (4,5 ml Kryoröhrchen, lagerte bei -80°C) versetzt. Danach wurde mit steriler 10 ml-Pipette aufgeschwemmt, in zwei kleine beschriftete Kulturflaschen (T25) überführt und in den Brutschrank gestellt (37°C, 5% CO₂).

Hochzüchten der Zellkultur

Das Epstein-Barr-Virus ist nach ca. 10 Tagen in die Lymphozyten eingeschleust. In dieser Zeit wurde das Medium nie abgesaugt, sondern immer nur mit vorgewärmtem Nährmedium (Medium III) bis zur Orangefärbung gefüttert. Die kleinen Kulturflaschen wurden nur bis 3 / 4 der Gesamthöhe gefüttert und darüberhinaus mit steriler Pasteurpipette gesplittet. Das Umsetzen in große Kulturflaschen erfolgte erst nach 10 Tagen, wenn die Lymphozyten etwas agglutiniert waren. 20 ml vorgewärmtes Nährmedium wurden vorgelegt, der gesamte Inhalt der kleinen Kulturflasche in eine große Kulturflasche überführt, die kleine Flasche mit Medium III ausgespült und ebenfalls in die große Flasche überführt. Die große Kulturflasche wurde nur bis zur Hälfte der Gesamthöhe gefüllt, das Medium einmal wöchentlich gewechselt. Das Zellwachstum vom Ansatz bis zum Einfrieren dauerte mindestens 4 Wochen.

Einfrieren der Zellkultur

1. Herstellen des Einfriermediums: Bestehend aus Medium II (kalt), 20 % FKS, 10 % DMSO; z. B. 20 ml Einfriermedium bestanden aus: 16 ml Medium II, 2 ml FKS, 2 ml DMSO. Das DMSO wurde immer zum Schluss zugegeben, da ansonsten das FKS ausfällt. Das Einfriermedium wurde bis zum Gebrauch in den Kühlschrank gestellt.

2. Das Medium von zwei dicht bewachsenen Zellkulturflaschen wurde bis auf 20 ml pro Flasche abgesaugt und die Zellen in den restlichen 20ml in ein 50 ml Gefäß überführt und bei 1400 rpm für 12 min zentrifugiert.

3. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet sofort mit 5 ml vorgekühltem Einfriermedium suspendiert, in beschriftete Kryoröhrchen bis zur Markierung eingefüllt und für ca. 2 Stunden bei -20°C vorgefroren. Danach wurde es über Nacht bei -80°C in den Kühlschrank gestellt.

4. Die Endgefrierung und Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C .

Herstellen des EBV-Überstands

Zwei Kryoröhrchen mit Lymphozyten aus dem Stickstofftank wurden langsam unter der Sterilbank aufgetaut, angesetzt und hochgezüchtet. Nach genügend Wachstum wurden die zwei kleinen Kulturflaschen (T25) in zwei große (T75) überführt, weiter gefüttert und hochgezüchtet. Das Medium wurde nie abgesaugt. Dann wurde der Inhalt so lange gesplittet, bis acht große Kulturflaschen mit je 60-70 ml gefüllt waren. Nach genügend Wachstum und Farbumschlag des Mediums nach zitronengelb verblieben die Kulturflaschen noch 1-2 Tage unter der Sterilbank bei Raumtemperatur, um durch den dadurch ausgelösten Stress eine möglichst hohe Virusdichte im Überstand zu erzielen. Der gesamte Kulturflascheninhalt wurde auf acht 50 ml Gefäße verteilt und 12 min bei 1400 rpm zentrifugiert.

Alle Überstände wurden im Filteraufsatz der Nalgene-Filtereinheit gesammelt.

Die Filtereinheit $0,45\ \mu\text{m}$ wurde an eine Vakuumpumpe angeschlossen und der Überstand filtriert.

4,5 ml Kryoröhrchen wurden mit EBV-Überstandsnummer beschriftet und der EBV-Überstand mit steriler Einmalpipette bis zur Markierung eingefüllt. Die fertigen Kryoröhrchen wurden zuerst stehend bei -80°C , dann gut verpackt bei -80°C gelagert.

Aktivitätskontrolle des EBV-Überstands

Um die Aktivität des neuen EBV-Überstands zu testen, wurde mit einem Untersuchungsblut ein doppelter Ansatz gemacht, das heißt wie im Arbeitsgang ‚Zellpräparation‘ beschrieben, wurde das Lymphozytensediment mit 10 ml Medium III aufgeschwemmt und diese Suspension auf zwei kleine Kulturflaschen verteilt. Eine Flasche wurde mit dem laufenden EBV-Überstand und die zweite Flasche mit dem

neuen EBV-Überstand versetzt. Das Ergebnis wurde im Journal und im EBV-Buch vermerkt. Erst nach einem positiven Ergebnis wurde der neue EBV-Überstand freigegeben.

Einfrieren des EBV-Zellpellets

Das EBV-Zellpellet wurde wie im Arbeitsgang ‚Zellkulturen einfrieren‘ beschrieben behandelt und eingefroren. Das Einfriermedium bestand aus 16 ml Medium II, 2 ml FKS und 2 ml DMSO. Die Zellpellets von zwei 50 ml Gefäßen wurden mit 5 ml Einfriermedium aufgeschwemmt und auf vorher beschriftete 1,8 ml Kryoröhrchen verteilt. Zuerst wurde es 2 Stunden lang bei -20°C vorgefroren, dann über Nacht bei -80°C im Gefrierschrank und schließlich bei -196°C im Stickstofftank gelagert.

4.2.4 DNA-Extraktion

Zellyse

Um die Leukozyten zu lysieren und die DNA freizusetzen, wurde das Leukozyten-Zellpellet mit dem QIAamp DNA Blood Maxi Kit der Firma Quiagen gemäss der gegebenen Anleitung (Quiagen, 2001) versetzt. Die so gewonnene DNA kann dann für die Hochdurchsatzgenotypisierung verwendet werden.

4.2.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA Quantifizierung wurde mit der SYBR-Green Methode durchgeführt. Die DNA- Proben wurden 1:3125 mit SYBR-Green Lösung (3,25 µl SYBR-Green I Stammlösung + 11ml 0,2 x TE) verdünnt, die Fluoreszenz mit dem Tecan GENios Fluoreszenzreader gelesen und die Konzentration anhand einer Eichkurve aus genomischer DNA berechnet.

Im Folgenden werden die Materialien, sowie die einzelnen Arbeitsschritte beschrieben.

Materialien und Geräte zur DNA Konzentrationsbestimmung

Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
96 well Platte	Greiner
Aluminium adhesive seals	
50 ml Konische PP- Röhrchen	Sarstedt

Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
SYBR-Green dsDNA quantitation reagent	SYBR-Green Malecular Probes (Cat# P-7581)
1x TE, ph 7,4	Tris Base, EDTA (Roth)
Clontech Human Genomic DNA 100ng/µl	Clontech

Geräte

Geräte	Hersteller
GENios Pro™	Tecan AG, Schweiz
Vortexer Reax	Heidolph

Vorbereitung der gDNA Standards

Zunächst wurden 100 µl von 1x TE jeweils auf die ersten zwei Reihen einer 96 well Platte (Säulen B-H, Abb. 15) pipettiert. Als nächstes wurden 200 µl der humanen genomischen DNA (Clontech; 100 ng/µl) in die ersten zwei Reihen der Säule A pipettiert.

Im Anschluß wurde mit Säule A beginnend eine Verdünnungsreihe hergestellt. Hierbei wurden der Säule A 100 µl entnommen und in Säule B pipettiert. Nach fünfmaligem Umrühren mit der Pipettenspitze wurden 100 µl von Säule B in Säule C transferiert. Ebenso wurde mit den Säulen D- G verfahren. Säule H wurde zur Bestimmung des Referenzwertes (1xTE: 0ng/µl gDNA) verwendet. Die Platte wurde versiegelt und als Standard DNA beschriftet bei 4°C gekühlt gelagert.

Die Arbeitsschritte sind in Abb. 15 dargestellt, und man erhält die in der folgenden Tabelle angegebenen Konzentrationen.

Konzentrationen der gDNA in den einzelnen Säulen

Reihen/ Säulen		Konzentration (ng/ μ l)	Volumen in μ l
A1	A2	100	100
B1	B2	50	100
C1	C2	25	100
D1	D2	12,5	100
E1	E2	6,25	100
F1	F2	3,125	100
G1	G2	1,5262	200
H1	H2	0	100

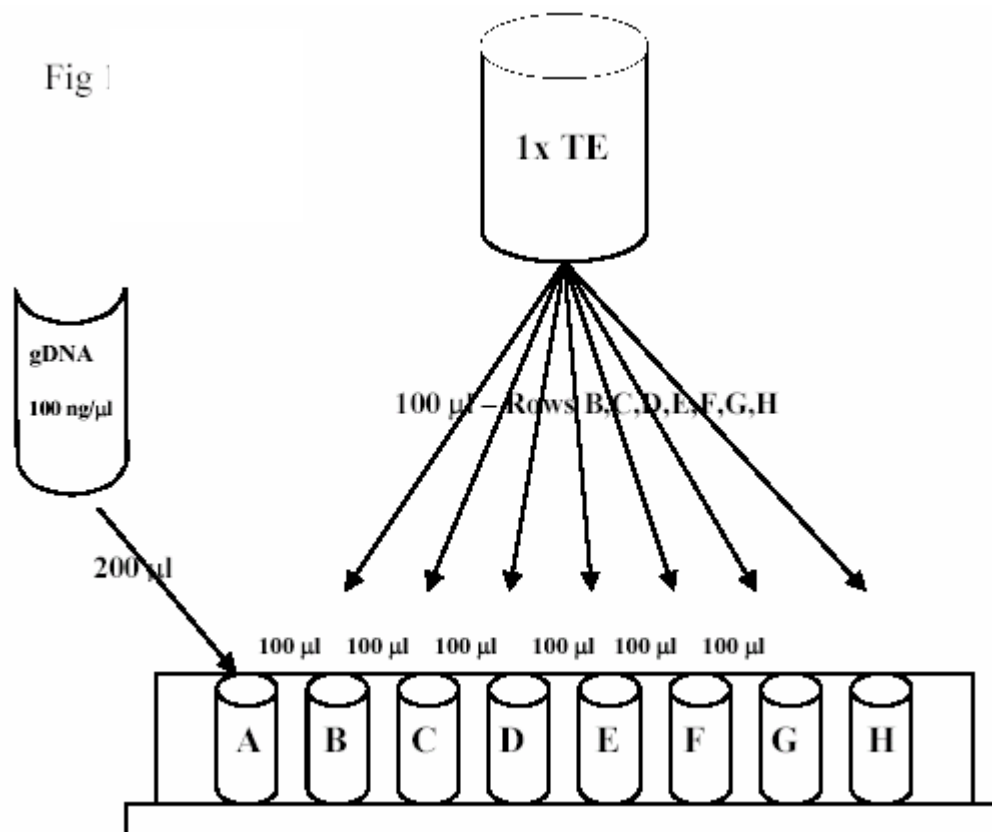


Abb. 15: Durchführung der Verdünnungsreihe

Vorbereitung der Messplatte

Je 5 μ l der gDNA Standard Verdünnungsreihe wurden in eine Meßplatte pipettiert (Q-Standard, Abb. 15), eine weitere Platte mit den zu bestimmenden DNA- Proben belegt (ebenfalls je 5 μ l).

Die gefrorenen SYBR-Green Reagenzien wurden ca. 60 min. bei Raumtemperatur in einem lichtundurchlässigen Container aufgetaut. In einem mit Aluminiumfolie umhüllten 50 ml Röhrchen (Lichtschutz) wurde eine Verdünnung von 1:200 SYBR-Green mit 1x TE hergestellt. Die folgende Tabelle zeigt die Volumenangaben der Reagenzien für eine bzw. zwei Meßplatten.

Volumenverteilung der Reagenzien

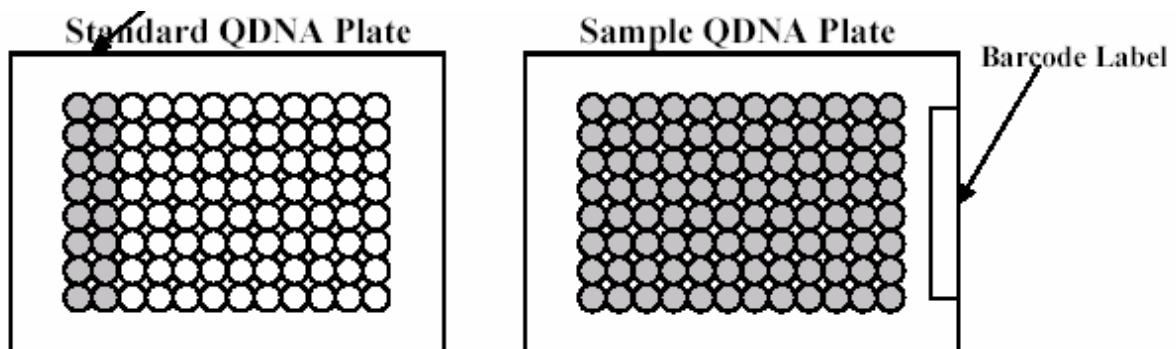
QDNA Platte	SYBR-Green (µl)	Volumen	Volumen 1x TE(ml)
1	115		23
2	215		43

Die Reagenzien wurden mit Hilfe des Vortexer gemischt, und dann mit einer Dispenser- Pipette aufgezogen.

Mit Hilfe der Dispenser- Pipette wurden zunächst 195 µl SYBR-Green Verdünnung in die Reihen 1 und 2 der Säulen A-H der Standard QDNA Platte pipettiert, und dann direkt mit Aluminiumfolie verdeckt.

Ebenso wurde mit der Sample QDNA Platte verfahren.

Abbildung 16 stellt dar, wie die Pipettierung erfolgen sollte.



● = 195 µl SYBR-Green

Abb.16: Pipettierung der DNA Platten

Durchführung der Messung

Das Photometer (Genios) wurde eingeschaltet und das Programm Xflour4 gestartet. Die Makros wurden aktiviert, mit dem Befehl " Menü: Xflour4/ connect" öffnete sich das Fach.

Die folgenden Einstellungen wurden vorgenommen:

Der Filter wurde mittels des Befehls "Xflour/ move plate and filter" kontrolliert.

Excitation wavelengt 485 nm und Emission wavelength 540 nm wurden gewählt.

Als Messmodus wurde "Fluoreszenz" eingestellt. Die verwendete Platte war GRE96fb.pdf.

Die Messparameter waren folgende:

Fluoreszenzfilter: fluorescein

Gain: manual 60

Lesemodus: top

Integration: lag time

Integrationszeit: 40 μ sec

Flash: Anzahl der Flashes 10 (3)

Schütteln: 10 sec

Die Messung wurde wie folgt durchgeführt:

Die Platte wurde eingelegt, der Befehl "Xflour4/ start measurement" gegeben. Die Platte wurde eingezogen und die Messung durchgeführt. Die Messwerte wurden in eine neue Excel Tabelle eingefügt und die Tabelle auf Diskette abgespeichert. Die Messung wurde mit dem Befehl "disconnect" beendet, das Programm geschlossen, abgemeldet und das Photometer ausgeschaltet.

Berechnung:

Anschließend wurde die Konzentration mittels der Eichkurve (SYBR-Green) berechnet und die Tabellenwerte in Makro übertragen. Die Qualität der Messung wurde mit der Standard Kurve Pearson RSQ überprüft, wobei der Wert von 0,99 als "sehr gut" und 0,98 als "akzeptabel" eingestuft wurden.

4.2.6 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die Genotypisierung der DNA-Proben erfolgte mittels des MASS ARRAY *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight* Systems (MASS ARRAY MALDI-TOF System).

Massenspektrometrische Verfahren sind in der Analytik niedermolekularer chemischer Verbindungen seit langem im Einsatz. Durch die Entwicklung der Matrix

gestützten Laserdesorption und Ionisation (engl. matrix assisted laser desorption ionization, MALDI) durch Karas und Hillenkamp als schonende Ionisierungsmethode in der Massenspektrometrie (MS) sind auch Biopolymere einer genauen Massenanalyse zugänglich geworden (Karas et al. 1998). Mit dieser neuen Methode können auch grosse Makromoleküle bis zu einigen hunderttausend Dalton intakt ionisiert und ihre exakte molekulare Masse bestimmt werden. Durch die Kopplung mit einem Flugzeitanalysator (engl. time of flight, TOF) wird die MALDI Massenspektrometrie zunehmend für die Analyse biochemischer und genetischer Fragestellungen genutzt.

Physikalische Grundlagen der MALDI-TOF-MS

Wird ein Analyt mit einem ca. tausendfachen molaren Überschuss eines geeigneten organischen Moleküls (Matrix) gemischt, so erfolgt nach Verdunstung des Lösungsmittels eine Kokristallisation von Matrix und Analyt. Die Ausbildung dieses Kokristalls ist die essentielle Voraussetzung für den MALDI-Prozess (Karas et al. 1998). Im Hochvakuumssystem (ca. 10^{-8} - 10^{-6} mbar) wird über eine Optik ein kurzer Laserpuls (N_2 -Laser: $\lambda = 337$ nm, $t = 3$ -5 ns) auf den Kokristall gelenkt. Über die resonante elektronische Anregung der π -Elektronensysteme der Matrixmoleküle wird die zur Ionisation notwendige Energie eingekoppelt (Ehring et al. 1996). Anschliessend wird die in den Matrixmolekülen kurzfristig gespeicherte Energie in das Festkörpergitter relaxiert und induziert dort eine starke Störung. Vor dem Erreichen des thermischen Gleichgewichts kommt es zu einem explosionsartigen Phasenübergang, währenddessen neben den Matrixmolekülen auch die Analytmoleküle in die Gasphase freigesetzt werden. Wenn die eingestrahelte Energie in einem Bereich zwischen 10^6 und 10^7 W/cm² liegt, lässt sich ein thermischer Zerfall der labilen Biomakromoleküle wie Proteine oder DNA nahezu verhindern, da die Matrix einen weiteren Energietransfer zum Analyten unterbindet (Karas et al. 1993). Neben der wichtigen Funktion bei der Laserdesorption kommt der Matrix auch eine entscheidende Rolle bei der Ionisation der Analytmoleküle zu: Die photoionisierten Matrixmoleküle bewirken durch den Prozess des Protonentransfers der gebildeten Radikale eine hohe Ausbeute an elektrisch geladenen Analytmolekülen (Scott et al. 1995). Als Folge des MALDI-Prozesses liegen in der Regel einfach geladene, intakte Analytmoleküle in der Gasphase des Hochvakuumsystems vor. Diese Ionen werden

anschliessend in einem elektrostatischen Feld von 100 bis einigen 1000 V/mm beschleunigt. Durch die Polarität des angelegten Feldes können entweder positive oder negative Ionen selektiert werden.

Die gebräuchlichste Form der Massenanalyse stellt die Kopplung des MALDI-Prozess mit einem Flugzeitanalysator dar (Abbildung 17).

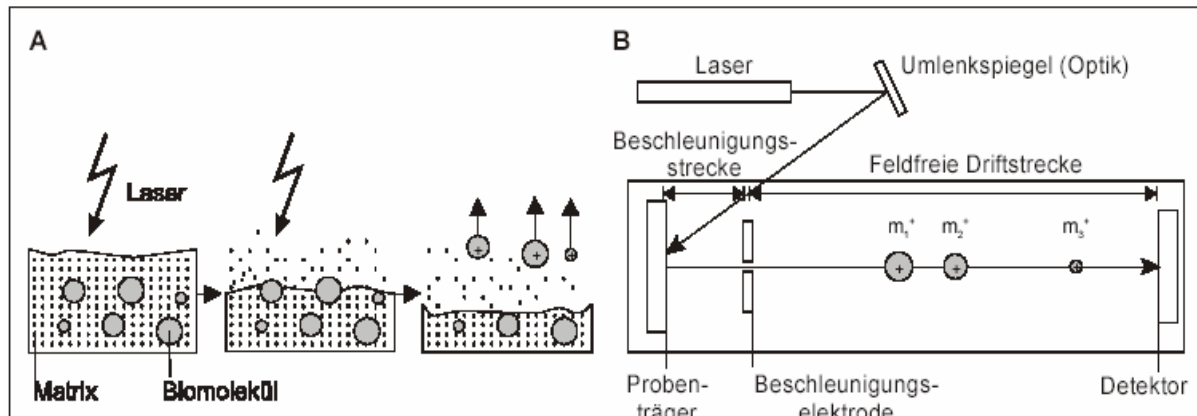


Abb. 17: Schematische Darstellung des Prinzips der MALDI-TOF-MS.

(A) Matrix unterstützte Laser-Desorption und Ionisation.

(B) Analyse der molekularen Massen über die Flugzeit.

Durch die genaue Messung der Zeitspanne, die ein Ion benötigt, um die feldfreie, definierte Driftstrecke zwischen der Beschleunigungselektrode und dem Detektor zu durchfliegen, ist eine exakte Bestimmung der molekularen Masse des Analytmoleküls möglich. Ausgehend von der angelegten Beschleunigungsspannung U folgt durch den Energieerhaltungssatz für die kinetische Energie E_{kin} der Ionen:

$$\text{A) } E_{\text{kin}} = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 = z \cdot e \cdot U$$

Das Produkt der Ionenladung z , der Elementarladung e und der Beschleunigungsspannung U ist somit direkt proportional zum Produkt der Masse m und dem Quadrat der Geschwindigkeit v der Ionen. Durch die bekannte Flugstrecke L , die der feldfreien, definierten Driftstrecke nach der Beschleunigung entspricht, kann mit Hilfe der für diese benötigten Zeit t die Geschwindigkeit v des Ions nach der folgenden Gleichung, berechnet werden:

$$\text{B) } v = L / t$$

Durch das Einsetzen von Gleichung B) in Gleichung A) und Umstellungen kann die Grundgleichung der Flugzeitauswertung eines Massenspektrometers erhalten werden:

$$C) \quad m / z = k \cdot t^2$$

Nach der Gleichung C) ist somit das Verhältnis von Masse m und Ladung z des Ions dem Quadrat der Flugzeit t proportional. In der Konstante k sind die Elementarladung e , die angelegte Beschleunigungsspannung U und die umkehrt proportionale quadratische Flugstrecke L enthalten:

$$D) \quad k = (2 \cdot e \cdot U) / L^2$$

Das Anlegen eines zusätzlichen Potentials an das Ende der feldfreien Driftstrecke, dass der primären Beschleunigungsspannung entgegengesetzt und im Betrag höher als dieses, in einer geeigneten Geometrie werden Ionen mit gleicher Masse, aber unterschiedlicher Geschwindigkeit auf einen weiteren Detektor fokussiert (Reflektor). Im Zusammenspiel mit der dadurch erhaltenen verlängerten Driftstrecke trägt diese Reflexion zu einer erheblich verbesserten Auflösung bei. Das Auflösungsvermögen R (engl. resolution), das heisst die Fähigkeit, Ionen mit kleinen Massenunterschieden noch getrennt registrieren zu können, ist für einen Massenanalysator von grosser Bedeutung. Es ist definiert als Quotient aus Masse m und Massendifferenz Δm mit der ein zweites Ion mit der Masse $m + \Delta m$ noch getrennt werden kann:

$$E) \quad R = m / \Delta m = m_1 / (m_2 - m_1)$$

Traditionell wird bei Flugzeitanalysatoren das Auflösungsvermögen aus einem Signal bestimmt. Die sogenannte Halbwertsbreite FWHM (engl. full width at half maximum) des Signals, also bei 50 % seiner Höhe, wird hierbei als Δm gesetzt.

MALDI-TOF-MS basierte DNA-Analytik

In der modernen Bioanalytik nimmt die MALDI-TOF-MS eine entscheidende Schlüsselrolle ein. Alle wichtigen Biopolymere (Proteine/Peptide, Kohlenhydrate,

Nukleinsäuren) sowie Lipide können mit MALDI-TOF-MS auf molekularem Niveau detailliert charakterisiert werden.

Im Gegensatz zu gelelektrophoretischen und chromatographischen Techniken der Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen kann mittels MALDI-TOF-MS eine viel höhere Genauigkeit (ca. 0,001 %) und Auflösung unterschiedlicher Molekülspezies erreicht werden.

Durch die Entdeckung der 3-Hydroxypikolinsäure als adäquate Matrix für Nukleinsäuren konnte die MALDI-TOF-MS, die zuvor nahezu nur für proteinchemische Fragestellungen angewendet wurde, auch im Bereich der DNA-Analytik als wertvolles Werkzeug verwendet werden (Wu et al. 1993). Die einzelnen Nukleotide in der DNA besitzen eine spezifische molekulare Masse: G (329 Da), A (313 Da), T (304 Da), und C (289 Da). Die kleinste Massendifferenz der Nukleotide besteht mit 9 Da zwischen A und T, die grösste zwischen G und C mit 40 Da. Aufgrund der molekularen Massen der einzelnen Nukleotide kann jeder Nukleinsäuresequenz eine spezifische molekulare Gesamtmasse zugeordnet werden. Im Gegensatz zu Methoden der DNA-Analytik, bei denen sekundäre, relative Moleküleigenschaften wie z.B. elektrophoretische Mobilitäten gemessen werden, nutzt die MALDI-TOF-MS basierte DNA-Analytik somit die primäre, intrinsische, absolute Eigenschaft der molekularen Masse als Messparameter.

Auch die Sequenzierung von RNA konnte mit MALDI-TOF-MS analog zu den methodischen Ansätzen der DNA-Sequenzierung erfolgreich durchgeführt werden (Faulstich et al. 1997).

Zur Genotypisierung insbesondere von SNPs bietet sich die Primerextensions-Reaktion mit anschliessender Analyse der Extensionsprodukte über MALDI-TOF-MS an (Bonk et al. 2001 und Haff et al. 1997). In der initialen PCR-Reaktion wird die Zielsequenz, die den genotypisierenden Polymorphismus beinhaltet, aus genomischer DNA amplifiziert. Das generierte PCR-Produkt kann entweder aufgereinigt werden, oder aber die überschüssigen PCR-Primer und freien dNTPs werden durch S1-Exonuklease und Shrimp alkalische Phosphatase abgebaut. In der eigentlichen Primerextensions-Reaktion wird ein der uniformen Zielsequenz komplementäres Oligonukleotid verwendet, das direkt 5' vor dem Polymorphismus endet. Durch ein spezifisches Set von ddNTPs, die dem zu genotypisierenden Allelen entsprechend gewählt werden, wird der Primer allelspezifisch durch eine

thermostabile DNA-Polymerase in einem PCR ähnlichen Temperaturprogramm um ein Nukleotid verlängert (extendiert). Aufgrund der spezifischen Massendifferenzen der eingesetzten ddNTPs werden informative, definiert extendierte Oligonukleotide generiert, deren molekulare Massen nach entsprechender Reinigung mit MALDI-TOF-MS detektiert werden können.

Durch die An- bzw. Abwesenheit der informativen molekularen Massen kann eindeutig auf den Genotyp der untersuchten genomischen DNA geschlossen werden. Da bei diesem Testansatz, der auch als "PinPoint-Assay" bezeichnet wird, nur ddNTPs verwendet werden, wird der Primer in jedem Fall nur um ein Nukleotid verlängert. Die minimale Massendifferenz der generierten Produkte beträgt 9 Da, wenn ein A/T-Polymorphismus vorliegt. Durch Zusatz von Zuckern (Fruktose oder Fucose) zur Matrix lässt sich die nötige Auflösung für diese minimalen Massendifferenz erhöhen, da der Übergang der überschüssigen Einleitung und Grundlagen Laserenergie auf die Oligonukleotide minimiert wird. Als Alternative zum PinPoint-Assay kann der Primer auch durch eine Kombination von einem SNP-spezifischen Set von ddNTPs und dNTPs extendiert werden. Als Produkte der Extensions-Reaktion entstehen bei heterozygoten Proben zwei Oligonukleotide, die sich um die Masse eines Nukleotids unterscheiden (kleinste Massen ddC: 273 Da). Durch die vergrößerte Massendifferenz im Vergleich zum PinPoint-Assay werden die sonst nötigen hohen Erfordernisse bezüglich Reinigung (Entsalzung) und Auflösung in der MALDI-TOF-MS deutlich erniedrigt. Somit ist diese Methode weniger störanfällig und damit auch für den Hochdurchsatz praktikabler. Die Genotypisierung von mehreren SNPs in einem MALDI-TOF-MS basierten Ansatz (Multiplex) ist ebenfalls durchführbar (Bonk et al. 2001 und Haff et al. 1997). Mit der Anwendung von modifizierten Nukleotiden und Oligonukleotiden zur MALDI-TOF-MS basierten Genotypisierung können auch die auftretenden Massendifferenzen der Extensionsprodukte moduliert werden (Haff et al. 1997).

Mit Hilfe chemischer Modifizierungen der Oligonukleotide, die zu einer festen Verankerung einer Ladung führen, können Nukleinsäuren mit MALDI-TOF-MS effizient analysiert werden (Gut et al. 2001). Aufbauend auf der Verwendung dieser "Ladungs-Tags" können MALDI-TOF-MS basierte Genotypisierungen ausgehend von PCR-amplifizierter DNA in einem mehrschrittigen Pipettier-Protokoll durchgeführt werden: Zuerst werden die überschüssigen dNTPs der PCR-Reaktion durch Shrimp alkalische Phosphatase abgebaut. Anschliessend wird eine Primerextensions-

Reaktion mit einem SNP-spezifischen Set aus α S-dNTPs und α S-ddNTPs durchgeführt. Die unmodifizierte DNA wird anschliessend mit 5'-Phosphodiesterase abgebaut.

Die modifizierten Produkte werden alkyliert, um eine Erhöhung der Sensitivität im MALDI-Prozess zu erreichen. Durch dieses reine Pipettier-Protokoll mit mehreren Inkubationsschritten erübrigt sich eine Reinigung der DNA für die MALDI-TOF-MS. Der beschriebene Ansatz wird als "GOOD-Assay" bezeichnet und kann automatisiert durchgeführt werden (Gut et al. 2001). In einem alternativen Ansatz zur Genotypisierung von SNPs können statt konventioneller Oligonukleotidprimer Peptidnukleotidsäuren (PNAs), eingesetzt werden. Die PNAs besitzen einige strukturbedingte Vorteile, die auch eine gute Anwendbarkeit für die MALDI-TOF-MS Analytik gewährleisten. Sie reichen von guter thermischer Stabilität, über hohe Spezifität zu einer verminderten Ausbildung von unerwünschten Sekundärstrukturen. Griffin et al. (1997) konnten mit Hilfe der PNAs vier SNPs im Tyrosinase Gen zuverlässig detektieren.

Die Möglichkeit der Analyse von repetitiven DNA-Sequenzen mit MALDI-TOF-MS ist bisher nur an wenigen Beispielen zu belegen. Der repetitive AluVpA DNA Marker in Intron 5 des Interferon-Rezeptorgens konnte nach PCR aus genomischer DNA mit einer Primerextensions-Reaktion und finaler MALDI-TOF-MS bestimmt werden (Braun et al. 1997). Ebenfalls konnte ein kurzer Tandemrepeat, der aus einer vier Basen umfassenden Wiederholungseinheit besteht, mit MALDI-TOF-MS detektiert werden (Krebs et al. 2001). Die Genotypisierung einer Dinukleotidwiederholung konnte von Krebs et al. über Ribozym geschnittene RNA Transkripte erreicht werden (Krebs et al. 2001).

Die DNA-Chiptechnologie, bei der einzelsträngige Oligonukleotide in einem Punktraster an einer Oberfläche immobilisiert werden und als Sonden zur allelspezifischen Hybridisierung dienen, kann mit der MALDI-TOF-MS als Detektionssystem gekoppelt werden. Im Gegensatz zur Fluoreszenzdetektion können nach den nötigen Hybridisierungs- und Waschschrritten die Probenmoleküle nach Kokristallisation mit der Matrix mit MALDI-TOF-MS analysiert werden. Alternativ können PCR-Amplifikate aus genomischer DNA über eine chemische Kopplung an Mikroarrays gebunden werden. Die kovalent gebundenen PCR Amplifikate dienen als Matrize für die allelspezifischen Primerextensions-Reaktionen, deren Produkte mit MALDI-TOF-MS bezüglich ihrer molekularen Masse zur Genotypisierung

analysiert werden. Dieser Chipbasierte Ansatz konnte bei der Analyse des HLA-DR2 Polymorphismus erfolgreich eingesetzt werden (Worrall et al. 2000). Die Mikroarray-Technologie, die eine hohe Packungsdichte erreichen kann, in Kombination mit enzymatischen Reaktionen auf dem Chip und finaler massenspektrometrischer Analyse der Produkte wird bezüglich ihres Automatisierungsgrads und den damit verbundenen potentiellen Hochdurchsatzeigenschaften für die klinische Diagnostik zur Zeit stark diskutiert (Leushner et al. 2000)

5 Ergebnisse

Die untersuchten Marker des RGS4-Gens sind auf Chromosom 1 in einer Region lokalisiert, zu der in der aktuellen Literatur signifikante Kopplungs- beziehungsweise Assoziationshinweise beschrieben sind. Um die Ergebnisse in einem deutschen Kollektiv zu replizieren, wurden 184 deutsche Schizophrene und 184 deutsche gesunde Kontrollen (Tabelle 9) mittels MALDI-TOF MS bezüglich der Marker rs2661319 (SNP18), rs951436 (SNP4) und rs951439 (SNP7) genotypisiert

5.1 Analyse des Markers rs2661319 (SNP18) des RGS4-Gens

Allelverteilung

Die Datenauswertung ergab die in Tabelle 10 veranschaulichte Allelverteilung innerhalb der Patienten- und Kontrollgruppe.

Tab 10: Darstellung der Allelverteilung des rs2661319 Polymorphismus

Gruppe	A-Allel n (%)	G-Allel n (%)	Gesamt n
Kontrollen	180 (48,9)	188 (51,1)	368
Patienten	194 (52,7)	174 (47,3)	368
Gesamt	374 (50,8)	362 (49,2)	736

Es fand sich kein signifikanter Unterschied in der Allelverteilung zwischen Patienten- und Kontrollgruppe. Beide Allele sind ungefähr gleich häufig vorhanden.

$$\chi^2 = 1,066, \text{ OR} = 0,859 \text{ (CI} = 0,643 - 1,147), \text{ df} = 1, \text{ p} = 0,302$$

Genotypverteilung

In der Analyse der Kontroll- und Patientengruppe waren die Genotypen des Polymorphismus rs2661319 innerhalb des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts verteilt.

Gruppe Kontrollen $\chi^2 = 0,000$, df = 2, p = 1,000	Gruppe Patienten $\chi^2 = 0,044$, df = 2, p = 0,978
---	--

Die möglichen Genotypen wurden wie folgt zugewiesen:

Genotyp 1 = homozygot A/A

Genotyp 2 = Heterozygotie für A/G

Genotyp 3 = homozygot G/G

Die Genotypverteilungen in der Kontroll- und Patientengruppe sind aus Tabelle 11 ersichtlich.

Tab 11: Darstellung der Genotypverteilung des rs2661319 Polymorphismus

Gruppe	Genotyp 1 A/A n (%)	Genotyp 2 A/G n (%)	Genotyp3 G/G n (%)	Gesamt n
Kontrollen	44 (23,9)	92 (50,0)	48 (26,1)	184
Patienten	50 (27,2)	94 (51,1)	40 (21,7)	184
Gesamt	94 (25,5)	186 (50,5)	88 (23,9)	368

Die Frequenzen der Genotypen zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Patientengruppe.

$\chi^2 = 1,132$, df = 2, p = 0,568

Tabelle 12 ist eine Zusammenstellung der Träger des G-Allels (A/G und G/G) gegenüber den Homozygoten für das A-Allel.

Tab 12: Darstellung der Häufigkeit der G-Träger (Genotypen 2 und 3) im Vergleich mit den homozygoten Trägern für das A-Allel (Genotyp 1) des rs 2661319 Polymorphismus

Gruppe	Genotyp A/A n (%)	Genotyp A/G und G/G n (%)	Gesamt n
Kontrollen	44 (23,9)	140 (76,1)	184
Patienten	50 (27,2)	134 (72,8)	184
Gesamt	94 (25,5)	274 (74,5)	368

Die Genotypfrequenzen wiesen zwischen Kontroll- und Patientengruppe keinen signifikanten Unterschied auf.

$$\chi^2 = 0,514, \text{ OR} = 0,842 \text{ (CI} = 0,527 - 1,347), \text{ df} = 1, \text{ p} = 0,473$$

In der Tabelle 13 wurden die A-Allel Träger in einer Gruppe zusammengefasst und mit den Homozygoten für das G-Allel verglichen.

Tab 13: Darstellung der Häufigkeit der A-Träger (Genotyp 1 und 2) im Vergleich mit den homozygoten Trägern für das G-Allel (Genotyp 3) des rs2661319 Polymorphismus

Gruppe	Genotyp A/A und A/G n (%)	Genotyp G/G n (%)	Gesamt n
Kontrollen	136 (73,9)	48 (26,1)	184
Patienten	144 (78,3)	40 (21,7)	184
Gesamt	280 (76,1)	88 (23,9)	386

Es war auch hier keine Assoziation zu Schizophrenie zu finden.

$$\chi^2 = 0,956, \text{ OR} = 0,787 \text{ (CI} = 0,487 - 1,273), \text{ df} = 1, \text{ p} = 0,328$$

5.2 Analyse des Markers rs951436 (SNP 4) des RGS4 Gens

Allelverteilung

Aus Tabelle 14 ergibt sich die Allelverteilung innerhalb der Patienten- und Kontrollgruppe.

Tab 14: Darstellung der Allelverteilung des rs951436 Polymorphismus

Gruppe	A-Allel n (%)	C-Allel n (%)	Gesamt n
Kontrollen	186 (50,8)	180 (49,2)	366
Patienten	200 (54,9)	164 (45,1)	364
Gesamt	386 (52,9)	344 (47,1)	730

Es besteht kein signifikanter Unterschied in der Allelverteilung zwischen Kontroll- und Patientengruppe. Beide Allele sind ungefähr gleich stark vertreten.

$$\chi^2 = 1,246, \text{ OR} = 0,847 \text{ (CI} = 0,633 - 1,133), \text{ df} = 1, \text{ p} = 0,264$$

Genotypverteilung

In der Kontroll- und Patientengruppe waren die Genotypen des Polymorphismus rs951436 innerhalb des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts verteilt.

Gruppe Kontrollen $\chi^2 = 0,221, \text{ df} = 2, \text{ p} = 0,895$	Gruppe Patienten $\chi^2 = 0,000, \text{ df} = 2, \text{ p} = 1,000$
--	---

Die möglichen Genotypen wurden wie folgt zugewiesen:

Genotyp 1 = homozygot A/A

Genotyp 2 = Heterozygotie für A/C

Genotyp 3 = homozygot C/C

Die Genotypverteilungen in der Kontroll- und Patientengruppe sind aus Tabelle 15 ersichtlich.

Tab 15: Darstellung der Genotypverteilung des rs951436 Polymorphismus

Gruppe	Genotyp 1 A/A n (%)	Genotyp 2 A/C n (%)	Genotyp 3 C/C n (%)	Gesamt n
Kontrollen	45 (24,6)	96 (52,5)	42 (23,0)	183
Patienten	55 (30,2)	90 (49,5)	37 (20,3)	182
Gesamt	100 (27,4)	186 (51,0)	79 (21,6)	365

Die Frequenzen der Genotypen zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Patientengruppe.

$$\chi^2 = 1,507, \text{ df} = 2, \text{ p} = 0,471$$

Tabelle 16 ist eine Zusammenstellung der Träger des C-Allels (A/C und C/C) gegenüber den Homozygoten für das A-Allel.

Tab 16: Darstellung der Häufigkeit der C-Träger (Genotypen 2 und 3) im Vergleich mit den homozygoten Trägern für das A-Allel (Genotyp 1) des rs951436 Polymorphismus

Gruppe	Genotyp A/A n (%)	Genotyp A/C und C/C n (%)	Gesamt n
Kontrollen	45 (24,6)	138 (75,4)	183
Patienten	55 (30,2)	127 (69,8)	182
Gesamt	100 (27,4)	265 (72,6)	365

Die Genotypfrequenzen wiesen zwischen Kontroll- und Patientengruppe keinen signifikanten Unterschied auf.

$$\chi^2 = 1,454 \text{ OR} = 0,753 \text{ (CI} = 0,474 - 1,195), \text{ df} = 1, \text{ p} = 0,228$$

In der Tabelle 17 wurden die A-Allel Träger in einer Gruppe zusammengefasst und mit den Homozygoten für das C-Allel verglichen.

Tab 17: Darstellung der Häufigkeit der A-Träger (Genotyp 1 und 2) im Vergleich mit den homozygoten Trägern für das C-Allel (Genotyp 3) des rs951436 Polymorphismus

Gruppe	Genotyp A/A und A/C n (%)	Genotyp C/C n (%)	Gesamt n
Kontrollen	141 (77,0)	42 (23,0)	183
Patienten	145 (79,7)	37 (20,3)	182
Gesamt	286 (78,4)	79 (21,6)	365

Die Ergebnisse zeigen keine signifikanten Differenzen zwischen der Kontroll- und Patientengruppe.

$$\chi^2 = 0,370, \text{ OR} = 0,857 \text{ (CI} = 0,520 - 1,411), \text{ df} = 1, \text{ p} = 0,543$$

5.3 Analyse des Markers rs951439 (SNP 7) des RGS4-Gens

Allelverteilung

Die Datenauswertung ergab die in Tabelle 18 veranschaulichte Allelverteilung innerhalb der Patienten- und Kontrollgruppe.

Tab 18: Darstellung der Allelverteilung des rs951439 Polymorphismus

Gruppe	C-Allel n (%)	T-Allel n (%)	Gesamt n
Kontrollen	212 (57,6)	156 (42,4)	368
Patienten	201 (54,6)	167 (45,4)	368
Gesamt	413 (56,1)	323 (43,9)	736

Es besteht kein signifikanter Unterschied in der Allelverteilung zwischen Patienten- und Kontrollgruppe. Beide Allele sind ungefähr gleich stark vorhanden.

$$\chi^2 = 0,668 \text{ OR} = 1,129 \text{ (CI} = 0,844 - 1,511), \text{ df} = 1, \text{ p} = 0,414$$

Genotypverteilung

In der Analyse der Kontroll- und Patientengruppe waren die Genotypen des Polymorphismus rs951439 innerhalb des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts verteilt.

Gruppe Kontrollen $\chi^2 = 0,183, \text{ df} = 2, \text{ p} = 0,913$	Gruppe Patienten $\chi^2 = 0,177, \text{ df} = 2, \text{ p} = 0,915$
--	---

Die möglichen Genotypen wurden wie folgt zugewiesen:

Genotyp 1 = homozygot C/C

Genotyp 2 = Heterozygotie für C/T

Genotyp 3 = homozygot T/T

Die Genotypverteilungen in der Kontroll- und Patientengruppe sind aus Tabelle 19 ersichtlich.

Tab 19: Darstellung der Genotypverteilung des rs951439 Polymorphismus

Gruppe	Genotyp 1 C/C n (%)	Genotyp 2 C/T n (%)	Genotyp 3 T/T n (%)	Gesamt n
Kontrollen	59 (32,1)	94 (51,1)	31 (16,8)	184
Patienten	57 (31,0)	87 (47,3)	40 (21,7)	184
Gesamt	116 (31,5)	181 (49,2)	71 (19,3)	368

Die Frequenzen der Genotypen zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Patientengruppe.

$$\chi^2 = 1,446, df = 2, p = 0,485$$

Tabelle 20 ist eine Zusammenstellung der Träger des T-Allels (CT und TT) gegenüber den Homozygoten für das C-Allel.

Tab 20: Darstellung der Häufigkeit der T-Träger (Genotypen 2 und 3) im Vergleich mit den homozygoten Trägern für das C-Allel (Genotyp 1) des rs951439 Polymorphismus

Gruppe	Genotyp C/C n (%)	Genotyp CT und TT n (%)	Gesamt n
Kontrollen	59 (32,1)	125 (67,9)	184
Patienten	57 (31,0)	127 (69,0)	184
Gesamt	116 (31,5)	252 (68,5)	368

Die Genotypfrequenzen wiesen zwischen Kontroll- und Patientengruppe wiederum keinen signifikanten Unterschied auf.

$$\chi^2 = 0,050, OR = 1,052 (CI = 0,677 - 1,633), df = 1, p = 0,822$$

In der Tabelle 21 wurden die C-Allel Träger in einer Gruppe zusammengefasst und mit den Homozygoten für das T-Allel verglichen.

Tab 21: Darstellung der Häufigkeit der C-Träger (Genotyp 1 und 2) im Vergleich mit den homozygoten Trägern für das T-Allel (Genotyp 3) des rs951439 Polymorphismus

Gruppe	Genotyp C/C und C/T n (%)	Genotyp T/T n (%)	Gesamt n
Kontrollen	153 (83,2)	31 (16,8)	184
Patienten	144 (78,3)	40 (21,7)	184
Gesamt	297 (80,7)	71 (19,3)	368

Wiederum ergab sich kein signifikanter Unterschied in den Genotypfrequenzen zwischen den beiden Gruppen.

$$\chi^2 = 1,414, \text{ OR} = 1,371 \text{ (CI} = 0,814 - 2,309), \text{ df} = 1, \text{ p} = 0,234$$

6 Diskussion

Übersicht der experimentellen Befunde

Für die vorangestellte Hypothese dieser Arbeit, dass Polymorphismen des RGS4 Gens mit Schizophrenie assoziiert sein könnten, lassen sich aufgrund der Untersuchungsergebnisse folgende Aussagen treffen:

In der vorliegenden Stichprobe konnte keine Assoziation zwischen den untersuchten Polymorphismen des RGS4 Gens mit der Diagnose Schizophrenie festgestellt werden.

Diskussion der Ergebnisse im Spiegel der Literatur

Der folgende Abschnitt 6.1 bietet eine Übersicht zu Design und Resultaten von Referenzstudien (Tabelle 22). Abschnitt 6.2 beinhaltet eine kritische Beurteilung der Resultate dieser Arbeit im Vergleich zu denen der primären Referenzstudie (Chowdari et al. 2002) bzw. der darüber hinaus zitierten Studien. Abschnitt 6.3 befaßt sich mit der abschließenden Beurteilung der Ergebnisse der untersuchten Einzel-Nukleotid-Polymorphismen und Abschnitt 6.4 bietet schließlich einen Ausblick auf zukünftige Untersuchungen. In diesem Zusammenhang werden auch Erklärungsmöglichkeiten für divergierende Befunde diskutiert.

6.1 Überblick zu Design und Resultaten von Referenzstudien

Studie von Chowdari et al. an Populationen von Kaukasiern, Afroamerikanern und Indern

In ihrer Assoziations- und Kopplungsstudie untersuchten Chowdari et al. RGS4 Polymorphismen eines Patientenkollektivs aus drei verschiedenen Ethnizitäten:

1. Pittsburgh, USA, mit 93 Kind-Eltern Trios kaukasischer Abstammung, davon 55 mit Schizophrenie und 38 mit schizoaffektiver Störung; zusätzlich 70 Afroamerikaner für die SNP 14-Analyse

2. NIMH (National Institute of Mental Health Collaborative Genetics Initiative), USA, mit 39 Kind-Eltern Trios und 30 betroffenen Geschwisterpaaren. Sie umfassten 25 kaukasische, 10 afroamerikanische und 4 Trios anderer Ethnizität.
3. Neu Delhi, Indien, mit 269 Kind-Eltern Trios und 72 betroffenen Geschwisterpaare

Chowdari et al. identifizierten 26 RGS4-SNPs und wählten 13 für die TDT-(Transmission Disequilibrium Test) Analyse aus.

Bei den kaukasischen Pittsburgh-Schizophreniepatienten zeigte sich eine Assoziation für SNP 4 und verschiedene Haplotypen, die bis auf einen, die SNPs1, 4, 7 oder 18 enthielten. Bei den Patienten mit schizoaffektiver Störung konnte keine Assoziation ermittelt werden.

Die SNPs der Pittsburgh-Studie wurden auch bei den ethnisch unterschiedlichen NIMH-Patienten analysiert. Sowohl die SNPs1, 4 und 18 als auch die verschiedenen Haplotypen, die die SNPs1, 4, 7 und 18 umfassten, erbrachten signifikante Ergebnisse.

Da die US-amerikanischen Proben Assoziationen mit den SNPs 1, 4, 7 oder 18 erbracht hatten, erforschten Chowdari et al. diese SNPs auch in der dritten Patientengruppe indischer Ethnizität aus Neu Delhi. Eine Assoziation mit der Schizophrenie konnte für die individuellen SNPs und Haplotypen nicht gefunden werden. Bei einem Haplotyp der Kern SNPs zeigte sich ein Trend.

Mit über 1400 Teilnehmern präsentiert die Studie von Chowdari et al. eine entscheidende Untersuchung eines plausiblen Kandidatengens. Eine genomische Region von ca. 300 kb wurde untersucht. Assoziationen ergaben sich für vier SNPs, die sich innerhalb einer 10 kb Region des RGS4-Gens befinden. Die SNPs liegen in der Promoter-Region. Da die assoziierten Allele und Haplotypen aber voneinander abweichende Ergebnisse erbrachten, müssen weitere Untersuchungen unternommen werden.

In Folgestudien versuchten verschiedene Arbeitsgruppen die Experimente Chowdaris et al. zu verifizieren und zu komplettieren.

Studie von Morris et al. an einer irischen Population

Morris et al. (2003) untersuchten 249 Patienten (196 mit Schizophrenie und 53 mit schizoaffektiver Störung) und 231 Kontrollprobanden irischen Ursprungs. Für diese Patientengruppe fanden sie einen Trend zur Assoziation mit den SNPs 1, 4, 7 und 18. Die Beschränkung ihrer Erhebung auf die Schizophreniepatienten erbrachte allerdings einen Hinweis für eine Assoziation der SNP 1 und SNP 7 mit der Schizophrenie. Zusätzlich zeigte sich ein Trend für SNP 4. Die Haplotyp-Analyse zeigte ebenfalls eine Assoziation des 4-Marker-Haplotyps aus SNP 1, 4, 7 und 18. Sowohl bei Chowdari et al. wie bei Morris et al. zeigte sich eine Assoziation für das G-Allel bei SNP 1. Ebenso ergab sich eine übereinstimmende Assoziation mit dem G-G-G-G –Haplotyp.

Studie von Williams et al. an Populationen aus Irland und Großbritannien

Williams et al. (2004) versuchten in einer umfangreichen Studie mit 709 streng diagnostizierten Schizophreniepatienten und 710 Kontrollen ethnisch homogener britischer oder irischer Abstammung die von Chowdari et al. für die vier Kern-SNPs gefundene Assoziation zur Schizophrenie zu replizieren. SNP 4 und 18 zeigten signifikante Assoziation zu Schizophrenie. Dieses Ergebnis stimmt mit dem von Chowdari et al. überein, die über Assoziation für SNP 4 in beiden US- und für SNP 18 in der NIMH-Stichprobe berichteten. Keine Überstimmung ergab die Untersuchung der drei bzw. vier-Marker-Haplotypen, die bei Chowdari et al. die stärkste Assoziation erbracht hatten. Nur ein zwei-Marker-Haplotyp aus SNP 1 und 4 zeigte signifikante Assoziation, der Haplotyp aus SNP 1 und 18 wies einen Trend zur Assoziation auf.

Studie von Talkowski et al. an einer kaukasischen Population aus USA

Talkowski et al. (2003) untersuchten klinische Subgruppen aus Pittsburgh (n = 91), NIMH (n = 36), Neu Delhi (n = 239), Cardiff (n = 677) und Dublin (n = 235), um die divergierenden Ergebnisse der Studie von Chowdari et al (2002) weiter zu erforschen.

Sie stellten fest, dass das Ersterkrankungsalter für Schizophrenie bei Frauen mit dem RGS4-SNP 1 Genotyp GG signifikant um 1,3 Jahre (indische Ethnizität) bis zu 9 Jahre (Pittsburgh) herabgesetzt ist. Bemerkenswert ist, dass die Korrelation des SNP 1 mit dem Geschlecht und dem herabgesetzten Ersterkrankungsalter der Krankheit konsistent in den verschiedenen Populationen auftritt.

Studie von Chen et al. an irischen Populationen

Chen et al. (2004) versuchten obige Studie von Chowdari et al. mit 1400 Personen der Irish Study of High Density Schizophrenia Families (ISHDSF), gesammelt in Nordirland und der Republik Irland, zu replizieren. TDT Tests für die vier Kern-SNPs 1, 4, 7 und 18 ergaben moderate Assoziation mit SNP 18, SNP 4 war marginal signifikant, die SNPs 1 und 7 waren nicht signifikant. Die Haplotyp-Analyse der 2-, 3- und 4- Marker-Haplotypen zeigte, dass der Haplotyp, der mit 42 % am weitesten in den irischen Familien verbreitet ist, SNP 1 – 4 – 18 G-G-G, mit der Schizophrenie in dieser Stichprobe assoziiert ist. Chen et al. schlussfolgern, dass SNPs 1, 4 und 18 den Kernhaplotyp für die irischen Schizophrenie-Familien definieren. Diese Arbeit unterstützt also ebenfalls die postulierte Assoziation von RGS4 mit der Schizophrenie.

Tab 22: Überblick über die RGS4 Assoziations-Referenzstudien

Studie	Ethnizität	DC	Anzahl		SNP 1	SNP 4	SNP 7	SNP 18	Haplotyp	Ergebnis
Chowdari et al.	Weiss-Amerik. Indisch	1B+	93 Pittsburgh - Trios, 39 NIMH- Trios, 269 Indische Trios	13 SNPs	<u>x</u>	<u>x</u>	x	<u>x</u>	<u>x</u>	Assoziation mit 3 individuellen SNPs in Probanden der Verein. Staaten; Assoziation mit einem 4 SNP – Haplotyp in allen drei Kollektiven
Williams et al.	Britisch, Irisch	1A+	709 Pat., 710 Kontr.	4 SNPs	x	<u>x</u>	x	<u>x</u>	<u>x</u>	Assoziation mit zwei SNPs und Haplotyp 1,4
Morris et al.	Irisch	4B+	249 Pat., 231 Kontr.	4 SNPs	<u>x</u>	<u>x</u>	<u>x</u>	x	<u>x</u>	Assoziation mit 3 SNPs und einem 4 SNP-Haplotyp
Talkowski et al.	Weiß-Amerik., Indisch, Britisch, Irisch		127 Pat. 239 Pat. 912 Pat.	4 SNPs	<u>x</u>	x	x	x	x	Assoziation mit einem SNP
Chen et al.	Irisch	4B-	1400 Pat.	4 SNPs	x	<u>x</u>	x	<u>x</u>	<u>x</u>	Assoziation mit 2 SNPs u. Haplotyp 1,4,18

Diagnostische Kriterien (DC): 1 = DSM-IV, 4 = DMS-III-R; A = nur Schizophreniepatienten, B = schizophreses Spektrum eingeschlossen;

+ = strukturiertes Interview, - = keine klare Erwähnung eines strukturierten Interviews; x = untersuchte SNPs, x = SNPs mit Assoziation (Shirts et al. 2004)

6.2 Vergleich der untersuchten Einzel-Nukleotid-Polymorphismen mit den beschriebenen Studien

In den fünf beschriebenen Studien wurde eine Assoziation zwischen den vier Kern-SNPs auf dem RGS4-Lokus mit der Schizophrenie identifiziert, wobei die assoziierten SNPs und Haplotypen differieren (Tabelle 22). Chowdari et al. berichten über Assoziation mit SNPs 1, 4 und 18 sowie Haplotyp 1, 4, 7, 18, Morris et al. über SNP 1, 4 und 7 sowie denselben Haplotyp, Williams et al. über SNP 4 und 18 sowie Haplotyp 1, 4, Talkowski et al. über SNP 1 und Chen et al. über SNP 18 und Haplotyp 1, 4, 18.

Während alle Arbeiten jeweils Hinweise für die Assoziation von RGS4 mit der Schizophrenie liefern, ist das Muster der Assoziation bezüglich der Allele und Haplotypen unterschiedlich und noch nicht vereinbar, so dass weitere Replikationsstudien erforderlich sind.

Unterschiedliche Assoziationsmuster wurden aber auch bei anderen komplexen Krankheiten, für die Gene identifiziert wurden, einschließlich Schizophrenie (Schwab et al. 2003; Straub et al. 2002) beschrieben (Hugot et al. 2001). Bei der Assoziation des COMT-Gens mit der Schizophrenie wurde ebenfalls Allelvariabilität beschrieben. Obwohl z.B. der Val/Met-Polymorphismus mit Schizophrenie assoziiert wurde, gab es auch Studien, die über andere SNPs und Haplotypen berichteten (Shifman et al. 2002; Glatt et al. 2003). Auch bezüglich des Dysbindin-Gens wurde über unterschiedliche Allel-Assoziation zu Schizophrenie berichtet (Straub et al. 2002; Schwab et al. 2003).

Bezüglich RGS4 ist noch nicht klar, ob es sich hier um Heterogenität auf dem Niveau der Suszeptilitäts-Allele oder um Heterogenität in der LD-Struktur zwischen den verschiedenen Stichproben handelt.

Handelt es sich um Ersteres, können solche Unterschiede Variationen der relativen Mengen an verschiedenen Suszeptilitäts-Allelen jeder Probe reflektieren. Diese entstehen entweder zufällig, durch ethnische Heterogenität oder durch unterschiedliche Selektion zwischen Studien phänotypischer Variablen (O'Donovan et al. 1999) und werden selbst beeinflusst durch RGS4-Sequenzvariationen.

Weiterhin ist bei Fall-Kontroll Assoziationsstudien Koinzidenz die alternative Haupterklärung (Teng et al. 1999). Jedes Gen und jeder Polymorphismus besitzen eine außergewöhnlich geringe *a priori* Wahrscheinlichkeit für wirkliche Assoziation.

Obwohl eine zufällige Assoziation nur durch wiederholte Replikationsstudien mit einer ausreichend hohen Zahl an Studienteilnehmern ausgeschlossen werden kann, ist es wichtig hervorzuheben, dass beim RGS4-Gen auch moderat positive Kopplungsergebnisse, aufgrund der in anderen Studien erzielten signifikanten Hinweise auf Assoziation mit der Schizophrenie (Mirnics et al. 2001, Prasad et al. 2004), eine stärkere Plausibilität erhalten:

Auf RGS4 als Suszeptibilitätsgen für Schizophrenie deutet zusätzlich hin:

1. seine Position; es befindet sich in der Region 1q23.2 unmittelbar neben dem Suszeptibilitätslokus von Chromosom 1q21-q22 (Brzustowicz et al. 2000),
2. seine Funktion; es reduziert die Effekte von Neurotransmitter-Rezeptor-Interaktionen bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Druey et al. 1996), die auch in Schizophrenie involviert sind (Chowdari et al. 2002). Darüber hinaus weisen neue Untersuchungen darauf hin, dass es auch in die Signalübertragung bei Dopamin D2-Rezeptoren involviert ist (Taymans et al. 2003),
3. seine signifikant verringerten Expression im Gehirn von Schizophreniepatienten. Es ist von allen 19 menschlichen RGS-Transkripten am meisten im Gehirn angereichert, stark im zerebralen Kortex exprimiert (Erdley et al. 2004) und signifikant im Kortex von Schizophreniepatienten reduziert (Mirnics et al. 2001),
4. seine Interaktion mit ErbB3 mRNA (Thaminy et al. 2003); das ist von Interesse, weil ErbB3 mRNA im Gehirn von Schizophreniepatienten unterschiedlich exprimiert wird (Hakak et al. 2001; Tkachev et al. 2003). Darüber hinaus agiert die ErbB-Proteinfamilie als Rezeptor für Neuregulin, das selbst ein Suszeptibilitätsgen für Schizophrenie ist (Stefansson et al. 2002; Williams et al. 2003),
5. seine Assoziation mit verringertem DLPFC-Volumen bei ersterkrankten jungen Schizophreniepatienten (Prasad et al. 2004).

Es ist bis jetzt noch unsicher, welches die präzisen RGS4-Varianten sind, die ein primäres Risiko für Schizophrenie beinhalten und es ist auch möglich, dass bis jetzt noch unidentifizierte Varianten das Risiko übertragen.

Alle vier assoziierten SNPs sind nicht kodierende SNPs, aber SNP 1, 4 und 7 sind in der Region 5' des Gens, die eine Rolle in der Transkriptionsregulierung spielt, lokalisiert.

Es wäre aber auch möglich, dass diese Polymorphismen zu den nicht kodierenden RNAs, ncRNA, gehören, die regulierende Funktion besitzen. Unser Wissen über die ncRNAs ist noch sehr begrenzt, aber wie Perkins et al. (2004) festhielten, besitzen höhere Organismen nur etwa 2 – 3 % kodierende RNAs, cRNA, wohingegen ncRNAs den überwiegenden Teil darstellen. Es erscheint plausibel, dass die Komplexität eines höheren Organismus nur unzureichend durch diese geringe Anzahl an cRNAs beschrieben werden kann.

Die bis jetzt erhobenen Daten werfen wichtige Fragen für weitere Studien auf:

1. Beruhen die inkonsistenten Ergebnisse bezüglich SNPs eventuell auf noch unbekanntem genetischen Unterschieden?
2. Wie verhalten sich strukturelle Veränderungen zu funktionalen und neurokognitiven Unterschieden?
3. Was sind die molekularen Mechanismen, die zu Veränderungen im Gehirn führen?

Während funktionale Varianten also noch identifiziert werden müssen, sprechen die Daten der beschriebenen Studien dafür, dass es sich bei RGS4 um ein Suszeptibilitätsgen für Schizophrenie handelt, die diskrepanten Ergebnisse der vorliegenden Studie werden im nächsten Kapitel diskutiert. Trotzdem sind weitere Replikationen erforderlich, aber mit der Einschränkung, dass meistens anfängliche Studien einen gefundenen Effekt überbewerten (Ioannidis et al. 2001) und Folgestudien für die Replikation mit einer weitaus umfangreicheren Teilnehmerzahl durchgeführt werden müssen.

6.3 Abschließende Beurteilung der Ergebnisse der untersuchten Einzel-Nukleotid-Polymorphismen

Der Entdeckung von RGS4 und seiner Verifizierung als Kandidatengen der Schizophrenie lagen eine Reihe von Kopplungs- und Assoziation- und andere Studien zugrunde. Durch verschiedene Einzel-Nukleotid-Polymorphismen auf dem RGS4-Gen und die Bildung von Haplotypen, die signifikante Assoziation zur Schizophrenie zeigten, wurde RGS4 als interessantes Kandidatengen ausgewiesen (Chowdari et al. 2002).

Genomweite Metaanalysen von Kopplungsstudien zur Schizophrenie ergaben signifikante statistische Hinweise für Chromosom 1q21-22 als einem Suszeptibilitätslokus der Krankheit (Brzustowicz et al. 2000; Lewis et al. 2003).

Die Studienlage zeigt sowohl krankheitsspezifische Veränderungen der RGS4-Expression im Gehirn (Mirnics et al. 2001) als auch signifikante Assoziationsnachweise für vier Einzel-Nukleotid-Polymorphismen und aus diesen gebildeten Haplotypen (Chowdari et al. 2002; Morris et al. 2004; Talkowski et al. 2003; Williams et al. 2004; Chen et al. 2004).

Alle durchgeführten Arbeiten belegen Assoziation zur Schizophrenie und bieten damit Anhaltspunkte dafür, dass das RGS4-Gen als Faktor für die Prädisposition eines Individuums für Schizophrenie in Frage kommt. Sie stehen damit in Diskrepanz zur vorliegenden Studie. Für die Differenzen der Resultate kommen vielfältige Erklärungsmöglichkeiten in Betracht.

Ethnische Heterogenität

Der auffälligste Unterschied ist die Zusammensetzung der Populationen.

Während Chowdari et al. US-amerikanische Kaukasier, Afroamerikaner, US-Amerikaner anderer Abstammungen und Inder untersuchte, Talkowski et al. US-amerikanische Kaukasier, Briten, Iren und Inder heranzog, Morris et al. und Chen et al. ihre Untersuchungen mit Iren und Williams mit britischen Kaukasiern unternahmen, wurden in dieser Studie ausschließlich deutsche Probanden untersucht.

Anzahl der Studienteilnehmer

Während in der vorliegenden Arbeit nur jeweils 184 Patienten mit 184 Kontrollen verglichen wurden, rekrutierten die Referenzstudien ihre Ergebnisse aus einer weitaus größeren Teilnehmerzahl.

Diagnoseverfahren und Einschlusskriterien

Auch divergierende klinische Testverfahren und Einschlusskriterien bei der Diagnosestellung können die Assoziationsergebnisse beeinflussen.

Während ICD-10 und DSM-IV hierbei zahlreiche Gemeinsamkeiten zeigen, unterscheiden sich die anderen in den Referenzstudien angewandten diagnostischen Methoden deutlicher.

Im Gegensatz zum Vorgehen in dieser Studie wurden von manchen Untersuchern auch Probanden mit Erkrankungen des schizophrenen Spektrums einbezogen. Zu diesen zählen *per definitionem* schizoaffektive Störungen, schizotype Persönlichkeitsstörungen und andere Psychosen, inklusive psychotisch-affektive Störungen. Eine gemeinsame familiär-genetische Grundlage kann insbesondere für die Schizophrenie und die schizoaffektiven Erkrankungen postuliert werden (Maier et al. 1999).

Psychotische Störungen sind inkludiert in breite diagnostische Kategorien und obwohl die diagnostischen Kriterien für die Schizophrenie mit den aktuellen Klassifikationssystemen enger definiert worden sind, ist die Ansicht verbreitet, dass die Krankheit nicht eine einzige Störung sondern eine Mischung aus verschiedenen miteinander verwandten Störungen sein könnte (Stefansson et al. 2004).

Auch die Wahl der Kontroll-Probanden stellt eine mögliche Ursache für divergierende Ergebnisse dar. So könnte es bei den Kontroll-Probanden zwischen den einzelnen Studien Unterschiede in Alters- und Geschlechtsverteilung, Familienanamnese, Verwandtschaftsgrad, ethnischer Zugehörigkeit usw. geben.

Studiendesign

Weitere Erklärungsmöglichkeiten für die variierenden Resultate in den Studien können Populationsstratifikation oder ungenügende Stichprobengröße sein. Außerdem ist das Studiendesign nicht unerheblich.

Fall-Kontroll-Studien haben im Vergleich zu familienbasierten Studien, die den *Transmission Disequilibrium Test* (TDT) heranziehen, mehr statistische Power zur Detektierung von Assoziationen, da im TDT in der Kontrollgruppe nur Eltern, die heterozygot zu den in Frage kommenden Loci sind, effektive Informationen bieten.

Der TDT vermeidet dagegen falsch-positive Assoziation durch Populationsstratifikation, die sich in Fall-Kontroll-Studien auch bei sorgfältiger Auswahl der Gruppenteilnehmer als störender Faktor nicht gänzlich ausschließen lässt.

Der TDT ist auch robuster bei genetischer Heterogenität und hat eine größere statistische Aussagekraft. Zusätzlich zur Assoziationsinformation der nicht transmittierten elterlichen Anteile nutzt dieser Testansatz auch die Kopplungsinformation, die in der Segregation der elterlichen Anteile enthalten ist. Eine Entdeckung von Kopplung gelingt aber nur, wenn eine Assoziation vorhanden ist. Umgekehrt kann nur bei vorliegender Assoziation ein Kopplungshinweis gefunden werden.

Vor dem Hintergrund der Problemstellung einer unübersichtlichen Populationsstruktur in Assoziationsstudien als Folge der Mischung ethnischer, in der Häufigkeit der Krankheit oder der Markerallele differierender Gruppen, wurden schließlich Analysemethoden mit Familienmitgliedern als „interne Kontrollen“ populär (Sham et al. 2002).

Die Auswertungsverfahren, welche Assoziation unter Verwendung von Haplotypen untersuchen, besitzen eine größere statistische Aussagekraft bei der Feinkartierung als herkömmliche Assoziationsstudien. Da die ermittelten Assoziationen überwiegend mit nur geringen Effekten verbunden sind, lässt sich aber nicht vollständig erklären, wie überhaupt eine Detektion der betreffenden Regionen durch Kopplung gelingen konnte. Weitere Replikationsversuche erfordern demgemäß große Stichproben, die eine höhere analytische Aussagekraft gewährleisten (McGuffin et al. 2003).

Heterogenität

Eine weitere Erklärung für die Diskrepanz, dass die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Einzel-Nukleotid-Polymorphismen keine Assoziation zu Schizophrenie erbrachte, im Gegensatz dazu die zitierten Referenzarbeiten Assoziation zu verschiedenen SNPs und Haplotypen zeigten, könnte die Heterogenität erstens der Krankheit und zweitens der für sie verantwortlichen Gene sein.

Unter optimalen Umständen erklärt eine einzelne Mutation oder ein Einzel-Nukleotid-Polymorphismus bzw. ein Haplotyp einen großen Anteil des Phänotypen sowie der klinischen Ausprägung einer Erkrankung. Solche Umstände existieren im Falle der Schizophrenie praktisch nicht.

Wie in der Einleitung beschrieben, ist das Krankheitsbild der Schizophrenie sehr heterogen. Dies macht es problematisch, einen bestimmten Genotyp einem bestimmten Phänotyp zuzuordnen. Außerdem sind bei dieser Erkrankung Lokus- und Allel-Heterogenität üblich.

Da es sich wahrscheinlich um eine nicht nur multifaktorielle sondern auch polygenetische Krankheit handelt, können bei einigen Patienten die einen und bei einigen Patienten andere Gene Ursache für dieselbe Krankheit sein, wenn man davon ausgeht, dass viele Gene mit einem kleinen Effekt zur Entstehung beitragen. So wäre es also möglich, dass in den erwähnten Studien das RGS4-Gen ätiologisch bedeutsam war, während es in dieser Studie respektive dieser Population keine so große Rolle spielte und deshalb nicht als mit der Schizophrenie assoziiert gefunden wurde.

Genauso kann es nicht nur Unterschiede zwischen einzelnen Genen geben, sondern auch innerhalb eines Gens könnten mehrere Loci krankheitsverursachend sein. Dies würde auch erklären, warum verschiedene SNPs bzw. Haplotypen des RGS4-Gens positive Ergebnisse brachten.

Aufgrund der Studienlage kann davon ausgegangen werden, dass RGS4 oder ein Nachbar-Gen an der Pathophysiologie der Schizophrenie beteiligt sind.

Ein Nachbar-Gen kommt in Frage, weil es auch möglich ist, dass die bisher gefundenen assoziierten SNPs oder Haplotypen an eine dort lokalisierte, noch nicht identifizierte, letztendlich pathogenetische bzw. funktionelle Mutation gekoppelt sind. Eine solche pathogenetische und/oder funktionelle Variante könnte aber auch im kodierenden Abschnitt des RGS4-Gens liegen und dann zu einer Veränderung von

RGS4 auf Proteinebene führen. Der Polymorphismus könnte zudem im Intron, Promotor oder auch woanders liegen und über die Regulation der Genexpression seine krankheitsbegünstigende Wirkung entfalten.

6.4 Ausblick auf zukünftige Untersuchungen

Die vorliegende Arbeit konnte die Ergebnisse der Assoziationsstudien von Chowdari et al., Morris et al., Williams et al., Chen et al. und Talkowski et al. bezüglich des RGS4-Gens und der Schizophrenie nicht bestätigen. Ebenso sind die Ergebnisse der Studien, die die Assoziation von RGS4 und Schizophrenie untersucht haben, bezüglich der Einzel-Nukleotid-Polymorphismen und verschiedenen Haplotypen inkonsistent. Um zu beweisen, dass erstens das RGS4-Gen zur Suszeptibilität der Schizophrenie beiträgt und zweitens wie es pathophysiologisch wirkt, sind weitere Untersuchungen nötig.

Zunächst einmal wäre es wichtig, Replikationsstudien in noch viel größeren Stichproben durchzuführen. Möglicherweise existieren viele gemeinsame Varianten im RGS4-Gen mit moderaten aber realen Effekten auf das Krankheitsrisiko. Studien mit größerem Stichprobenumfang könnten auch solche Varianten identifizieren. Dabei sollte außerdem auf eine exakte und sichere Diagnose der Patienten geachtet werden. Ferner sollten die Studien in verschiedenen ethnischen Populationen kontrolliert werden. Vor allem sollten ausreichend viele Polymorphismen ausgewählt werden. Problematisch hierbei wird wiederum die Heterogenität des klinischen Bildes der Schizophrenie sein.

Es findet sich bei zugrunde liegender genetischer Prädisposition keine ubiquitär nutzbare pathophysiologische Erklärung für die Vielfalt klinischer Manifestationen. Kopplungs- und Gen-Identifikation wurden stets durch die Verwertung klassischer klinischer Phänotypen erreicht. Die alleinige klinische Charakterisierung des Phänotyps durch psychopathologische Merkmale ist aber unzureichend.

Zur Differenzierung könnte die Erfassung von neuropsychologischen und neurophysiologischen Normabweichungen zur Definition von so genannten Endophänotypen einen wesentlichen Fortschritt bieten. Die Identifikation dieser Vulnerabilitätsmarker könnte bei Personen im Risikoalter im Hinblick auf die Früherkennung und Frühintervention bei schizophrenen Störungen klinisch bedeutsam werden. Die Endophänotypen sind weiterhin möglicherweise

unmittelbarer als die klinischen Phänotypen Ausdruck bestimmter Genotypen und könnten sich daher auch besonders für molekulargenetische Untersuchungen eignen.

Im Bemühen um das Verständnis, wie Gene die Schizophrenie beeinflussen können, ist die Untersuchung von Genen auf Assoziation mit der Erkrankung nur der erste Schritt. So sind sorgfältige Untersuchungen der Effekte der assoziierten Einzel-Nukleotid-Polymorphismen und Haplotypen auf Expression und Funktion des Genproduktes erforderlich. Es muss verstärkt nach der funktionalen bzw. pathogenetischen Variante im RGS4-Gen oder einem seiner Nachbargene gesucht werden, um dann mit Hilfe molekularbiologischer Methoden die pathophysiologischen und kausalen Zusammenhänge zu identifizieren.

Erst wenn dies gelingen sollte, wäre bestätigt, dass das RGS4-Gen mit der Schizophrenie assoziiert ist. Dann stünden auch Möglichkeiten offen, neue Medikamente zu entwickeln, die kausal die Schizophrenie therapieren könnten. Im Bereich der Pharmakogenetik würde dies auch bedeuten, dass Art und Dosierung der Medikation in Abhängigkeit vom Genotyp der Patienten individuell angepasst werden könnten.

Mit dem besseren Verständnis der Pathogenese ist zudem die Hoffnung verbunden, Präventivmaßnahmen gegen den Ausbruch der Schizophrenie ergreifen zu können oder eine zuverlässigere Diagnose zu stellen. Dazu müsste aber auch geklärt werden, wie groß der Anteil des RGS4-Gens an der Suszeptibilität der Schizophrenie ist. Dies kann nur gelingen, indem die Suche nach weiteren Suszeptibilitätsgenen konsequent fortgesetzt wird, ferner Interaktionen zwischen dem RGS4-Gen und der Umwelt sowie anderen Genen erforscht werden.

7 Abkürzungen und Fachbegriffe

Abkürzung	Erklärung
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
B	Blindprobe
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
cAMP	Zyklisches Adenosin-Monophosphat
COMT	Catechol-O-methyltransferase
cM	Centimorgan
Df	Degrees of freedom (Freiheitsgrade)
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRD 3	Dopamin 3-Rezeptoren
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (Fourth Edition), Diagnostisches Manual der amerikanischen Psychiatrie-Vereinigung (4. Auflage)
DTNBP1	Dysbindin
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DZ	Dizygoter (zweieiiger) Zwilling
E	Embryonaltag
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
Fa.	Firma
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanin
Gi	Heterotrimäres G-Protein, das die Bildung von Adenylcyclase und cAMP inhibiert
G-olf	Heterotrimäres G-Protein, das an olfaktorische Rezeptoren bindet und Adenylcyclase und cAMP aktiviert
G-q	Heterotrimäres G-Protein, das Phospholipase C aktiviert
GAP	GTPase aktivierendes Protein
Gly	Glycin
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren

G-Protein	Guanin-Nukleotid Bindungsprotein
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphat spaltendes Enzym
h	Stunde
HCL	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
5-HAT	5-Hydroxy-Tryptamin (Serotonin)
ICD-10	International Classification of Diseases, Klassifikationssystem für Krankheiten der Weltgesundheitsorganisation
Kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton (Molekulargewicht)
L	Längenstandard
LSD	Lysergsäurediethylamin
M	Molar
Mbp	Mega-Basenpaare
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minute
Mg	Milligramm
ml	Milliliter
MLS	Maximum LOD Score
mM	Millimolar
mRNA	Boten-RNA
mV	Millivolt
MZ	Monozygote (eineiige) Zwillinge
N	Probandenzahl
Na ₂ EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
NfκB	Nuclear Factor κB
Ng	Nanogramm, 10 ⁻⁹ g
Nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NPL	Non-Parametric Linkage
NRG 1	Neuregulin 1
OD	Optische Dichte
OH-	Hydroxy-
OR	Odds Ratio
P	Signifikanz, p-Wert, probability
PCR	Polymerasekettenreaktion

pH	Wasserstoff-Ionenkonzentration
Primer	DNA-Oligonukleotid
RGS 4	Regulator of G-Protein signaling 4
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
Rpm	Rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
Ser	Serin
SKID I	Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV Achse I
SKID II	Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV Achse II
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAQ	Thermostabile Polymerase
TBE-Puffer	Tris-Borat-Na ₂ EDTA-Puffer
TM	Schmelztemperatur
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität
UV	Ultraviolett
ZNS	Zentrales Nervensystem
Z	log ₁₀
Z _{max}	Maßeinheit für das Vertrauen in ein statistisches genetische Ergebnis
°C	Grad Celsius
λ (lambda)	Wellenlänge
µg	Mikrogramm, 10 ⁻⁶ g
µl	Mikroliter, 10 ⁻⁶ l

8 Literaturverzeichnis

Abi-Dargham A, Rodenhiser J, Printz DI From the cover: increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000); 97: 8104–8109.

Akbarian S, Bunney WE, Jr., Potkin SG, Wigal SB, Hagman JO, Sandman CA, and Jones EG Altered distribution of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-diaphorase cells in frontal lobe of schizophrenics implies disturbances of cortical development. *Arch Gen Psychiatry*. (1993), 50 (3):169-177.

Akbarian S, Kim JJ, Potkin SG, Hetrick WP, Bunney WE, Jr., and Jones EG Maldistribution of interstitial neurons in prefrontal white matter of the brains of schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry*. (1996), 53 (5):425-436.

Andreasen N, Nasrallah HA, Dunn V, Olson SC, Grove WM, Ehrhardt JC, Coffman JA, and Crossett JH Structural abnormalities in the frontal system in schizophrenia. A magnetic resonance imaging study. *Arch Gen Psychiatry* (1986), 43 (2):136-144.

Andreasen N and Olsen S Negative versus positive schizophrenia. Definition and validation. *Arch Gen Psychiatry* (1982), 39 (7):789-794.

Andreasen NC Schizophrenia: the fundamental questions. *Brain Res.Brain Res.Rev.* (2000), 31 (2-3):106-112.

Barondes SH, Alberts BM, Andreasen NC, Bargmann C, Benes F, Goldman-Rakic P, Gottesman I, Heinemann SF, Jones EG, Kirschner M, Lewis D, Raff M, Roses A, Rubenstein J, Snyder S, Watson SJ, Weinberger DR, and Yolken RH Workshop on schizophrenia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* (1997), 94 (5):1612-1614.

Bassett AS, McGillivray BC, Jones BD, and Pantzar JT Partial trisomy chromosome 5 cosegregating with schizophrenia *Lancet* (1988), 1 (8589):799-801.

Bayer TA, Falkai P, and Maier W Genetic and non-genetic vulnerability factors in schizophrenia: the basis of the "two hit hypothesis". *J.Psychiatr.Res.* (1999), 33 (6):543-548.

Becker T, Elmer K, Mechela B, Schneider F, Taubert S, Schroth G, Grodd W, Bartels M, and Beckmann H MRI findings in medial temporal lobe structures in schizophrenia *Eur Neuropsychopharmacol.* (1990), 1 (1):83-86.

Beraki S, Aronsson F, Karlsson H, Ogren SO, Kristensson K.: Influenza A virus infection causes alterations in expression of synaptic regulatory genes combined with changes in cognitive and emotional behaviors in mice. *Mol Psychiatry*, (2004), 1-10.

Berkenkamp S, Kirpekar F, Hillenkamp F Infrared MALDI mass spectrometry of large nucleic acids. *Science.* (1998), 281: 260-262.

Berman DM, Wilkie TM & Gilman AG. GAIP and RGS4 are GTPase-activating proteins for the Gi subfamily of G protein α subunits. *Cell*. (1996), 86, 445–452.

Blackwood DH, Fordyce A, Walker MT, St Clair DM, Porteous DJ and Muir WJ Schizophrenia and affective disorders cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family. *Am. J. Hum. Genet.* (2001), 69, 428–433.

Bloom FE Advancing a neurodevelopmental origin for schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* (1993), 50 (3):224-227.

Blouin JL, Dombroski BA, Nath SK, Lasseter VK, Wolyniec PS, Nestadt G, Thornquist M, Ullrich G, McGrath J, Kasch L, Lamacz M, Thomas MG, Gehrig C, Radhakrishna U, Snyder SE, Balk KG, Neufeld K, Swartz KL, DeMarchi N, Papadimitriou GN, Dikeos DG, Stefanis CN, Chakravarti A, Childs B, Pulver AE, and Schizophrenia susceptibility loci on chromosomes 13q32 and 8p21. *Nat.Genet.* (1998), 20 (1):70-73.

Blouin JL, Dombroski BA, Nath SK, Lasseter VK, Wolyniec PS, Nestadt G, Thornquist M, Ullrich G, McGrath J, Kasch L et al. Schizophrenia susceptibility loci on chromosomes 13q32 and 8p21. *Nat. Genet.* (1998), 20, 70–73.

Bogerts B, Ashtari M, Degreef G, Alvir JM, Bilder RM, and Lieberman JA Reduced temporal limbic structure volumes on magnetic resonance images in first episode schizophrenia *Psychiatry Res.* (1990), 35 (1):1-13.

Braun A, Little DP, Reuter D, Muller-Mysok B, Koster H Improved analysis of microsatellites using mass spectrometry. *Genomics* (1997), 46: 18-23.

Brustowicz LM, Hodgkinson KA, Chow EW, Honer WG and Bassett AS Location of a major susceptibility locus for familial schizophrenia on chromosome 1q21–q22. *Science* (2000), 288, 678–682.

Buchanan RW, Vladar K, Barta PE, and Pearlson GD Structural evaluation of the prefrontal cortex in schizophrenia. *Am.J.Psychiatry.* (1998), 155 (8):1049-1055.

Burchett SA, Bannon MJ & Granneman JG RGS mRNA expression in rat striatum: modulation by dopamine receptors and effects of repeated amphetamine administration. *J. Neurochem.* (1999), 72, 1529–1533.

Burchett SA, Volk ML, Bannon MJ & Granneman JG Regulators of G protein signalling: rapid changes in mRNA abundance in response to amphetamine. *J. Neurochem.* (1998), 70, 2216–2219.

Camp NJ, Neuhausen SL, Tiobech J, Polloi A, Coon H and Myles-Worsley M Genomewide multipoint linkage analysis of seven extended Palauan pedigrees with schizophrenia, by a Markov-chain Monte Carlo method. *Am. J. Hum. Genet.* (2001), 69, 1278–1289.

Cannon TD, Kaprio J, Lonqvist J, Huttunen M, and Koskenvuo M The genetic epidemiology of schizophrenia in a Finnish twin cohort. A population-based modeling study. *Arch Gen Psychiatry.* (1998), 55 (1):67-74.

Cao Q, Martinez M, Zhang J, Sanders AR, Badner JA, Cravchik A, Markey CJ, Beshah E, Guroff JJ and Maxwell, ME Suggestive evidence for a schizophrenia susceptibility locus on chromosome 6q and a confirmation in an independent series of pedigrees. *Genomics*. (1997), 43, 1–8.

Carrasco GA, Zhang Y, Damjanoska KJ, D'Souza DN, Garcia F, Battaglia G, Muma NA and Van de Kar LD A region-specific increase in Ga and Ga11 Proteins in brains of rats during cocaine withdrawal. *JPET*. (2003), 307:1012-1019

Catts VS and Catts SV Apoptosis and schizophrenia: is the tumour suppressor gene, p53, a candidate susceptibility gene? *Schizophr.Res.* (2000), 41 (3):405-415.

Cavalli A, Druey KM, Milligan G The regulator of G protein signaling RGS4 selectively enhances alpha2A adrenoceptor stimulation of the GTPase activity of Go1alpha and Gi2alpha. *J Biol Chem* (2000); 275: 23693–23699.

Chen X, Dunham, C, Kendler S, Wang X, O'Neill FA, Walsh D, Kendler SK Regulator of G-protein signaling 4 (RGS4) gene is associated with schizophrenia in Irish high density families. *Am J Med Genet.* (2004), 1:23-26.

Chowdari KV, Semwal P, Wood J, Lawrence E, Bhatia T, Deshpande SN, B K T, Ferrell RE, Middleton FA, Devlin B, Levitt P, Lewis DA, Nimgaonkar VL.: Association and linkage analyses of RGS4 polymorphisms in schizophrenia. *Hum Mol Genet.* (2002), 12:1373-80.

Christian NP, Reilly JP, Mokler VR, Wincott FE, Ellington AD Elucidation of the initial step of oligonucleotide fragmentation in matrix-assisted laser desorption/ionization using modified nucleic acids. *J Am Soc Mass Spectrom.* (2001), 12: 744-753.

Cladman W and Chidiac P Characterization and comparison of RGS2 and RGS4 as GTPase-activating proteins for m2 muscarinic receptor-stimulated G(i). *Mol. Pharmacol.* (2002), 62, 654-659.

Coffey CE, Sullivan JL, and Rice JR T lymphocytes in schizophrenia. *Biol.Psychiatry.* (1983), 18 (1):113-119.

Collins FS, Patrinos A, Jordan E, Chakravarti A, Gesteland R, and Walters L New goals for the U.S. Human Genome Project: 1998-2003. *Science.* (1998), 282 (5389):682-689.

Cordeiro Q, Talkowski ME, Chowdari KV, Wood J, Nimgaonkar V, Vallada H.: Association and linkage analysis of RGS4 polymorphisms with schizophrenia and bipolar disorder in Brazil. *Genes Brain Behav.* (2005), 1:45-50.

Crow TJ Positive and negative schizophrenic symptoms and the role of dopamine. *Br.J.Psychiatry.* (1980), 137:383-386.

Damjanoska KJ, Van de Kar LD, Zhang Y, D'Souza DN, Garcia F, Battaglia G and Muma NA Chronic Fluoxetine differentially affects 5-Hydroxytryptamine 2A receptor signaling in Frontal Cortex, Oxytocin- and Corticotropin-Releasing Factor-containing neurons in rat Paraventricular Nucleus. *JPET*. (2003), 306:563-571.

Dauphinais ID, DeLisi LE, Crow TJ, Alexandropoulos K, Colter N, Tuma I, and Gershon ES Reduction in temporal lobe size in siblings with schizophrenia: a magnetic resonance imaging study. *Psychiatry Res.* (1990), 35 (2):137-147

De Vries L, Zheng B, Fischer T, Elenko E and Farquhar MG The regulator of G protein signaling family. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* (2000), 40, 235–271.

DeLisi LE, Goodman S, Neckers LM, and Wyatt RJ An analysis of lymphocyte subpopulations in schizophrenic patients. *Biol.Psychiatry.* (1982), 17 (9):1003-1009.

DeLisi LE, Hoff AL, Neale C, and Kushner M Asymmetries in the superior temporal lobe in male and female first-episode schizophrenic patients: measures of the planum temporale and superior temporal gyrus by MRI. *Schizophr.Res.* (1994), 12 (1):19-28.

DeLisi, L.E., Mesen, A., Rodriguez, C., Bertheau, A., LaPrade, B., Llach, M., Riondet, S., Razi, K., Relja, M., Byerley, W. et al. Genome-wide scan for linkage to schizophrenia in a Spanish-origin cohort from Costa Rica. *Am. J. Med. Genet.* (2002), 114, 497–508.

DeLisi, L.E., Shaw, S.H., Crow, T.J., Shields, G., Smith, A.B., Larach, V.W., Wellman, N., Loftus, J., Nanthakumar, B. and Razi, K. A genomewide scan for linkage to chromosomal regions in 382 sibling pairs with schizophrenia or schizoaffective disorder. *Am. J. Psychiatry.* (2002), 159, 803–812.

Diefendorf AR *Clinical Psychiatry, a Text-Book for Students and Physicians Abstracted and Adapted from the Sixth German Edition of Kraepelin's 'Lehrbuch der Psychiatrie'*. New York: Macmillan. (1902).

Druey DM, Blumer KJ, Kang VH, Kehrl JH Inhibition of G-protein-mediated MAP kinase activation by a new mammalian gene family. *Nature.* (1996), 379: 742-746.

Dworkin RH, Lenzenweger MF, Moldin SO, Skillings GF, and Levick SE A multidimensional approach to the genetics of schizophrenia. *Am.J.Psychiatry.* (1988), 145 (9):1077-1083.

Ehring BUR, Sundqvist H Existed state relaxation processes of maldi-matrices by luminescence spectroscopy. *Appl. Surf. Sc.* (1996), 96-98: 577-580.

Ekelund J, Lichtermann D, Hovatta I, Ellonen P, Suvisaari J and Terwilliger JD Genome-wide scan for schizophrenia in the Finnish population: evidence for a locus on chromosome 7q22. *Hum. Mol. Genet.* (2000), 9, 1049–1057.

Erdely HA, Lahti RA, Lopez MB, Myers CS, Roberts RC, Tamminga CA, Vogel MW Regional expression of RGS4 mRNA in human brain. *Eur J Neurosci.* (2004), 11:3125-3128.

Falkai P, Honer WG, David S, Bogerts B, Majtenyi C, and Bayer TA No evidence for astrogliosis in brains of schizophrenic patients. A post-mortem study. *Neuropathol.Appl.Neurobiol.* (1999), 25 (1):48-53.

Falkai P, Schneider-Axmann T and Honer WG Entorhinal cortex pre-alpha cell clusters in schizophrenia: quantitative evidence of a developmental abnormality. *Biol.Psychiatry*. (2000), 47 (11):937-943.

Faraone SV, Matise T, Svrakic D, Pepple J, Malaspina D, Suarez B, Hampe C, Zambuto CT, Schmitt K, Meyer J et al. Genome scan of European-American schizophrenia pedigrees: results of the NIMH Genetics Initiative and Millennium Consortium. *Am. J. Med. Genet.* (1998), 81, 290–295.

Farmer AE, McGuffin P, and Gottesman II Twin concordance for DSM-III schizophrenia. Scrutinizing the validity of the definition. *Arch Gen Psychiatry*. (1987), 44 (7):634-641.

Faulstich K, Worner K, Brill H, Engels JW A sequencing method for RNA oligonucleotides based on mass spectrometry. *Anal Chem*. (1997), 69: 4349-4353.

Fei Z, Ono T, Smith LM MALDI-TOF mass spectrometric typing of single nucleotide polymorphisms with mass-tagged ddNTPs. *Nucleic Acids Res*. (1998), 26: 2827-2828.
Feinberg I Schizophrenia: caused by a fault in programmed synaptic elimination during adolescence? *J.Psychiatr.Res*. (1982), 17 (4):319-334.

First MB, Spitzer RL, Gibbon M und Williams JBW. Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I and II Disorders. Washington, DC: American Psychiatric Press. (1997).

Franzek E and Beckmann H [Genetic heterogeneity of schizophrenia. Results of a systematic twin study]. *Nervenarzt*. (1996), 67 (7):583-594.

Fu DJ, Tang K, Braun A, Reuter D, Darnhofer-Demar B, Little DP, O'Donnell MJ, Cantor CR, Koster H Sequencing exons 5 to 8 of the p53 gene by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat Biotechnol*. (1998), 16: 381-384.

Fukui et al.: Molecular cloning of the human histamine H1 receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. (1994), 201:894.

Garver DL, Holcomb J, Mapua FM, Wilson R and Barnes B Schizophrenia spectrum disorders: an autosomal-wide scan in multiplex pedigrees. *Schizophr. Res*. (2001), 52, 145–160.

Gill M, Vallada H, Collier D, Sham P, Holmans P, Murray R, McGuffin P, Nanko S, Owen M, Antonarakis S et al. A combined analysis of D22S278 marker alleles in affected sib-pairs: support for a susceptibility locus for schizophrenia at chromosome 22q12. Schizophrenia Collaborative Linkage Group (Chromosome 22). *Am. J. Med. Genet.* (1996), 67, 40–45.

Glatt SJ, Faraone SV, Tsuang MT Association between a functional catechol O-methyltransferase gene polymorphism and schizophrenia: meta analysis of case-control and family-based studies. *Am J Psychiatry*. (2003), 160: 469-476.

Gold SJ, Ni YG, Dohlman HG & Nestler EJ Regulators of G-protein signaling (RGS) proteins: region-specific expression of nine subtypes in rat brain. *J. Neurosci*. (1977), 17, 8024-8037.

Greengard. P, Allen. PB, Nairn. AC,: Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron* (1999); 23: 435–447.

Griffin TJ, Tang W, Smith LM Genetic analysis by peptide nucleic acid affinity MALDI-TOF mass spectrometry [see comments]. *Nat Biotechnol.* (1997), 15: 1368-1372.

Gurling HM, Kalsi G, Brynjolfson J, Sigmundsson T, Sherrington R, Mankoo BS, Read T, Murphy P, Blaveri E et al. Genomewide genetic linkage analysis confirms the presence of susceptibility loci for schizophrenia, on chromosomes 1q32.2, 5q33.2, and 8p21–22 and provides support for linkage to schizophrenia, on chromosomes 11q23.3–24 and 20q12.1–11.23. *Am. J. Hum. Genet.* (2001), 68, 661–673.

Gut et al. Automation in genotyping of single nucleotide polymorphisms. *Hum Mutat.* (2001), 17: 475-492.

Haff LA, Smirnov IP Multiplex genotyping of PCR products with MassTag-labeled primers. *Nucleic Acids Res.* (1997), 25: 3749-3750.

Haff LA, Smirnov IP Single-nucleotide polymorphism identification assays using a thermostable DNA polymerase and delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry. *Genome Res.* (1997), 7: 378-388.

Hajek M, Huonker R, Boehle C, Volz HP, Nowak H, and Sauer H Abnormalities of auditory evoked magnetic fields and structural changes in the left hemisphere of male schizophrenics--a magnetoencephalographic-magnetic resonance imaging study. *Biol.Psychiatry.* (1997), 42 (7):609-616.

Hakak Y, Walker JR, Li C, Wong WH, Davis KL et al. Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia. *Proc Nat Acadf Sci USA.* (2001), 98, 4746-4751.

Halliday GM A review of the neuropathology of schizophrenia. *Clin Exp.Pharmacol.Physiol* (2001), 28 (1-2):64-65.

Harrison PJ, Owen MJ. Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications. *Lancet.* (2003), 361(9355):417-419.

Harrison PJ, Weinberger D Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry.* (2005), 1:40-68.

Hendren RL, DeBacker I and Pandina GJ Review of neuroimaging studies of child and adolescent psychiatric disorders from the past 10 years. *J.Am.Acad.Child Adolesc.Psychiatry.* (2000), 39 (7):815-828.

Henneberg A, Riedl B, Dumke HO and Kornhuber HH T-lymphocyte subpopulations in schizophrenic patients. *Eur Arch Psychiatry Neurol.Sci.* (1990), 239 (5):283-284.

Hettema JM, Walsh D and Kendler KS Testing the effect of season of birth on familial risk for schizophrenia and related disorders. *Br.J.Psychiatry.* (1996), 168 (2):205-209.

Houston et al. The human histamine H₂-receptor couples more efficiently to Sf9 insect cell Gs-proteins than to insect cell Gq-proteins: limitations of Sf9 cells for the analysis of receptor /Gq-protein coupling. *J. Neurochem.* (2002), 80:678.

Hovatta I, Varilo T, Suvisaari J, Terwilliger JD, Ollikainen V, Arajärvi R, Juvonen H, Kokko-Sahin ML, Vaisanen L, Mannila H et al. A genomewide screen for schizophrenia genes in an isolated Finnish subpopulation, suggesting multiple susceptibility loci. *Am. J. Hum. Genet.* (1999), 65, 1114–1124.

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J et al.: Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* (2001), 411: 599-603

Hunt TW, Fields TA, Casey PJ & Peralta EG RGS10 is a selective activator of Gai GTPase activity. *Nature* (1996), 383, 175–177.

Inayama Y, Yoneda H, Sakai T, Ishida T, Nonomura Y, Kono Y, Takahata R, Koh J, Sakai J, Takai A, Inada Y and Asaba H Positive association between a DNA sequence variant in the serotonin 2A receptor gene and schizophrenia. *Am.J.Med.Genet.* (1996), 67 (1):103-105.

Ingi T et al. Dynamic regulation of RGS2 suggests a novel mechanism in G-protein signalling and neuronal plasticity. *J. Neurosci.* (1998), 18, 7178–7188

Ioannidis JPA, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet.* (2001), 29(3): 306-309.

Isola NR, Allman SL, Golovlov VV, Chen CH Chemical cleavage sequencing of DNA using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem.* (1999), 71: 2266-2269.

Jablensky A and Cole SW Is the earlier age at onset of schizophrenia in males a confounded finding? Results from a cross-cultural investigation. *Br.J.Psychiatry.* (1997), 170:234-240.

Jakob H and Beckmann H Prenatal developmental disturbances in the limbic allocortex in schizophrenics. *J.Neural Transm.* (1986), 65 (3-4):303-326.

Karas F, Hillenkamp M Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry fundamentals and applications. *AIP-Conference-Proceedings.* (1993), 288: 447-458.

Karas M, Hillenkamp F Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* (1988), 60: 2299-2301.

Kaufmann R, Chaurand P, Kirsch D, Spengler B Post-source decay and delayed extraction in matrix-assisted laser desorption/ionization-reflectron time-of-flight mass spectrometry. Are there trade-offs? *Rapid Commun Mass Spectrom.* (1996), 10: 1199-1208.

Kaufmann CA, Suarez B, Malaspina D, Pepple J, Svrakic D, Markel PD, Meyer J, Zambuto CT, Schmitt K, Matise TC et al. NIMH Genetics Initiative Millennium

Schizophrenia Consortium: linkage analysis of African-American pedigrees. *Am. J. Med. Genet.* (1998), 81, 282–289.

Kendler KS, Gruenberg AM and Kinney DK Independent diagnoses of adoptees and relatives as defined by DSM-III in the provincial and national samples of the Danish Adoption Study of Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* (1994), 51 (6):456-468.

Kendler KS, MacLean CJ, O'Neill FA, Burke J, Murphy B, Duke F, Shinkwin R, Easter SM, Webb BT, Zhang J, Walsh D and Straub RE Evidence for a schizophrenia vulnerability locus on chromosome 8p in the Irish Study of High-Density Schizophrenia Families. *Am.J.Psychiatry.* (1996), 153 (12):1534-1540.

Kendler KS, McGuire M, Gruenberg AM and Walsh D Schizotypal symptoms and signs in the Roscommon Family Study. Their factor structure and familial relationship with psychotic and affective disorders. *Arch Gen Psychiatry.* (1995), 52 (4):296-303

Keshavan MS, Stanley JA, Montrose DM, Minshew NJ, Pettegrew JW Prefrontal membrane phospholipid metabolism of child and adolescent offspring at risk for schizophrenia or schizoaffective disorder: an in vivo (31)P MRS Study. *Mol Psychiatry.* (2003), 8: 316-323.

Kety SS, Wender PH, Jacobsen B, Ingraham LJ, Jansson L, Faber B and Kinney DK Mental illness in the biological and adoptive relatives of schizophrenic adoptees. Replication of the Copenhagen Study in the rest of Denmark. *Arch Gen Psychiatry.* (1994), 51 (6):442-455.

Kirpekar F, Douthwaite S, Roepstorff P Mapping posttranscriptional modifications in 5S ribosomal RNA by MALDI mass spectrometry. *Rna* 6: 296-306.
Bonk T, Humeny A (2001) MALDI-TOF-MS analysis of protein and DNA. *Neuroscientist.* (2000), 7: 6-12.

Kolle MR A new family of G-protein regulators – the RGS proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* (1997), 9, 143-147.

Kraepelin E *Dementia praecox. Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte*, 5. Auflage ed. Leipzig: Barth. (1896).

Krebs S, Seichter D, Forster M Genotyping of dinucleotide tandem repeats by MALDI mass spectrometry of ribozyme-cleaved RNA transcripts. *Nat Biotechnol.* (2001), 19: 877-880.

Kringlen E Twins--still our best method. *Schizophr.Bull.* (1976), 2 (3):429-433

Kwon Y, Tang K, Cantor C, Koster H, Kang C DNA sequencing and genotyping by transcriptional synthesis of chain- terminated RNA ladders and MALDI-TOF mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.* (2001), 29: E11.

Lander ES and Schork NJ Genetic dissection of complex traits. *Science.* (1994), 265 (5181):2037-2048.

Leopoldt et al. G Proteins endogenously expressed in Sf9 cells: interaction with mammalian histamine receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* (1997), 356:216.

Lerer B, Segman RH, Hamdan A, Kanyas K, Karni O, Kohn Y, Korner M, Lanktree M, Kaadan M, Turetsky N et al. Genome scan of Arab Israeli families maps a schizophrenia susceptibility gene to chromosome 6q23 and supports a locus at chromosome 10q24. *Mol. Psychiatry.* (2003), 8, 488–498.

Leushner J, Chiu NH Automated mass spectrometry: a revolutionary technology for clinical diagnostics. *Mol Diagn.* (2000), 5: 341-348.

Levinson DF, Holmans P, Straub RE, Owen MJ, Wildenauer DB, Gejman PV, Pulver AE, Laurent, C, Kendler KS, Walsh D et al. Multicenter linkage study of schizophrenia candidate regions on chromosomes 5q, 6q, 10p, and 13q: schizophrenia linkage collaborative group III. *Am. J. Hum. Genet.* (2000), 67, 652–663.

Lewis CM, Levinson DF, Wise LH, DeLisi LE, Straub RE, Hovatta I, Williams NM, Schwab SG, Pulver AE, Faraone SV, Brzustowicz LM, Kaufmann CA, Garver DL, Gurling HM, Lindholm E, Coon H, Moises HW, Byerley W, Shaw SH, Mesen A, Sherrington R, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS, Ekelund J, Paunio T, Lonqvist J, Peltonen L, O'Donovan MC, Owen MJ, Wildenauer DB, Maier W, Nestadt G, Blouin JL, Antonarakis SE, Mowry BJ, Silverman JM, Crowe RR, Cloninger CR, Tsuang MT, Malaspina D, Harkavy-Friedman JM, Svrakic DM, Bassett AS, Holcomb J, Kalsi G, McQuillin A, Brynjolfson J, Sigmundsson T, Petursson H, Jazin E, Zoega T and Helgason T Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. *Am.J.Hum.Genet.* (2003), 73 (1):34-48.

Lewis S Structural brain imaging in biological psychiatry. *Br.Med.Bull.* (1996), 52 (3):465-473.

Lewis DA, Levitt P Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu Rev Neurosci.* (2002), 25: 409-432

Lin A, Kenis G, Bignotti S, Tura GJ, De Jong R, Bosmans E, Pioli R, Altamura C, Scharpe S and Maes M The inflammatory response system in treatment-resistant schizophrenia: increased serum interleukin-6. *Schizophr.Res.* (1998), 32 (1):9-15.

Lindholm, E, Ekholm B, Shaw S, Jalonen P, Johansson G, Pettersson U, Sherrington R, Adolfsson R and Jazin E A schizophrenia-susceptibility locus at 6q25, in one of the world's largest reported pedigrees. *Am. J. Hum. Genet.* (2001), 69, 96–105.

Maier W und Schwab S Genetische Determination häufiger psychischer Störungen. In Ganten D, Ruckpaul K. (eds) *Handbuch der molekularen Medizin.* Berlin Heidelberg: Springer. (1999).

Maier W, Lichtermann D, Rietschel M, Held T, Falkai P, Wagner M, and Schwab S Genetics of schizophrenic disorders. New concepts and findings. *Nervenarzt.* (1999), 70 (11):955-969.

- Martinez M, Goldin LR, Cao Q, Zhang J, Sanders AR, Nancarrow DJ, Taylor JM, Levinson DF, Kirby A, Crowe RR et al. Follow-up study on a susceptibility locus for schizophrenia on chromosome 6q. *Am. J. Med. Genet.* (1999), 88, 337–343.
- Maynard TM, Sikich L, Lieberman JA, and LaMantia AS Neural development, cell-cell signaling, and the "two-hit" hypothesis of schizophrenia. *Schizophr.Bull.* (2001), 27 (3):457-476.
- McCarley RW, Shenton ME, O'Donnell BF, Faux SF, Kikinis R, Nestor PG, and Jolesz FA Auditory P300 abnormalities and left posterior superior temporal gyrus volume reduction in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* (1993), 50 (3):190-197.
- McGue M and Gottesman II Genetic linkage in schizophrenia: perspectives from genetic epidemiology. *Schizophr.Bull.* (1989), 15 (3):453-464.
- McGuffin P and Owen MJ Molecular genetic studies of schizophrenia. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* (1996), 61:815-822.
- McGuffin P, Owen MJ, and Farmer AE Genetic basis of schizophrenia. *Lancet.* (1995), 346 (8976):678-682.
- McGuffin P, Tandon K and Corsico A Linkage and association studies of schizophrenia. *Current Psychiatry Reports.* (2003), 5, 121-127.
- McNeil TF, Cantor-Graae E and Weinberger DR Relationship of obstetric complications and differences in size of brain structures in monozygotic twin pairs discordant for schizophrenia. *Am.J.Psychiatry.* (2000), 157 (2):203-212.
- Mirnics K, Middleton FA, Stanwood GD, Lewis DA, Levitt P.: Disease-specific changes in regulator of G-protein signaling 4 (RGS4) expression in schizophrenia. *Mol Psychiatry.* (2001), 3:293-301.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* (1998); 78: 189–225.
- Moises HW, Yang L, Kristbjarnarson H, Wiese C, Byerley W, Macciardi F, Arolt V, Blackwood D, Liu X, Sjogren B et al. An international two-stage genome-wide search for schizophrenia susceptibility genes. *Nat. Genet.* (1995), 11, 321–324.
- Möller HJ, Laux G, Deister A *Psychiatrie und Psychotherapie.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag. (2001) Schizophrenie.
- Möller HJ und Deister A In Möller HJ, Laux G, Kapfhammer HP (eds) *Psychiatrie und Psychotherapie.* Berlin-Heidelberg: Springer. (2000), Schizophrenie.
- Morris DW, Rodgers A, McGhee KA, Schwaiger S, Scully P, Quinn J, Meagher D, Waddington JL, Gill M, Corvin AP. Confirming RGS4 as a susceptibility gene for schizophrenia. *Am J Med Genet,* (2004), 1:50-53.

Müller N, Ackenheil M, Hofschuster E, Mempel W and Eckstein R Cellular immunity, HLA-class I antigens, and family history of psychiatric disorder in endogenous psychoses. *Psychiatry Res.* (1993), 48 (3):201-217.

Mullis KB The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci.Am.* (1990), 262 (4):56-5.

Muma NA, Mariyappa R, Williams K, Lee JM Differences in regional and subcellular localization of G (q/11) and RGS4 protein levels in Alzheimer's disease: correlation with muscarinic M1 receptor binding parameters. *Synapse* (2003); 47: 58–65.

Murray RM, O'Callaghan E, Castle DJ, and Lewis SW A neurodevelopmental approach to the classification of schizophrenia. *Schizophr.Bull.* (1992), 18 (2):319-332.

Naudin J, Capo C, Giusano B, Mege JL and Azorin JM A differential role for interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in schizophrenia? *Schizophr.Res.* (1997), 26 (2-3):227-233.

Nelson MD, Saykin AJ, Flashman LA and Riordan HJ Hippocampal volume reduction in schizophrenia as assessed by magnetic resonance imaging: a meta-analytic study. *Arch Gen Psychiatry.* (1998), 55 (5):433-440.

Ni YG et al. Region-specific regulation of RGS4 (regulator of G-protein-signalling protein type 4) in brain by stress and glucocorticoids: in vivo and in vitro studies. *J. Neurosci.* 19, (1999), 3674–3680

Nikkila H, Muller K, Ahokas A, Miettinen K, Andersson LC, and Rimon R Abnormal distributions of T-lymphocyte subsets in the cerebrospinal fluid of patients with acute schizophrenia. *Schizophr.Res.* (1995), 14 (3):215-221.

Nordhoff E, Cramer R, Karas M, Hillenkamp F, Kirpekar F, Kristiansen K, Roepstorff P Ion stability of nucleic acids in infrared matrix-assisted laserdesorption/ionization mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.* (1993), 21: 3347-3357.

Nordhoff E, Ingendoh A, Cramer R, Overberg A, Stahl B, Karas M, Hillenkamp F, Crain PF Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of nucleic acids with wavelengths in the ultraviolet and infrared. *Rapid Commun Mass Spectrom.* (1992), 6: 771-776.

O'Donovan MC and Owen MJ Candidate gene association studies of schizophrenia. *Am J Hum Genet.* (1999), 65: 587-592.

O'Donovan MC, Williams NM, Owen MJ. Recent advances in the genetics of schizophrenia. *Hum Mol Genet.* (2003); Spec No 2:125-133.

Onstad S, Skre I, Torgersen S and Kringlen E Twin concordance for DSM-III-R schizophrenia. *Acta Psychiatr.Scand.* (1991), 83 (5):395-401

Owen MJ Molecular genetic studies of schizophrenia. *Brain Res.Brain Res.Rev.* (2000), 31 (2-3):179-186.

Owen MJ, Williams NM, O'Donovan, MC. The molecular genetics of schizophrenia: new findings promise new insights. *Mol Psychiatry*, (2004), 1:14-27.

Pakkenberg B. Total nerve cell number in neocortex in chronic schizophrenics and controls estimated using optical disectors. *Biol Psychiatry*, (1993), 11:768-772.

Paunio T, Ekelund J, Varilo T, Parker A, Hovatta I, Turunen JA, Rinard K, Foti A, Terwilliger JD, Juvonen H et al. Genomewide scan in a nationwide study sample of schizophrenia families in Finland reveals susceptibility loci on chromosomes 2q and 5q. *Hum. Mol. Genet.* (2001), 10, 3037–3048.

Perkins DO, Jeffries C, Sullivan P Expanding the 'central dogma': the regulatory role of nonprotein coding genes and implications for the genetic liability to schizophrenia. *Mol Psychiatry*. (2005), 10: 69-78.

Popov SG, Krishna UM, Falck JR & Wilkie TM Ca²⁺/Calmodulin reverses phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent inhibition of regulators of G protein-signalling GTPase-activating protein activity. *J. Biol.Chem.* (2000), 275, 18962–18968.

Prasad KM, Chowdari KV, Nimgaonkar VL, Talkowski ME, Lewis DA, Keshavan MS. Genetic polymorphisms of the RGS4 and dorsolateral prefrontal cortex morphometry among first episode schizophrenia patients. *Mol Psychiatry*. (2004), 2:213-219.

Puhl HL III, Ikeda SR, Aronstam RS cDNA clones of human proteins involved in signal transduction sequenced by the Guthrie cDNA resource center (www.cdna.org). Submitted MAR-(2002) to the EMBL GenBank DDBJ databases

Quiagen: QIA amp DNA Blood Midi/Maxi Kit Handbook, 09/2001

Reiss D, Plomin R, and Hetherington EM Genetics and psychiatry: an unheralded window on the environment. *Am.J.Psychiatry*. (1991), 148 (3):283-291.

Rice JP, Reich T, Bucholz KK, Neuman RJ, Fishman R, Rochberg N, Hesselbrock VM, Nurnberger JI, Jr., Schuckit MA, and Begleiter H Comparison of direct interview and family history diagnoses of alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp.Res.* (1995), 19 (4):1018-1023.

Roberts GW, Colter N, Lofthouse R, Johnstone EC, and Crow TJ Is there gliosis in schizophrenia? Investigation of the temporal lobe. *Biol.Psychiatry*. (1987), 22 (12):1459-1468.

Ross EM and Wilkie TM GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu. Rev. Biochem.* (2000), 69:795

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, and Erlich HA Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. (1988), 239 (4839):487-491.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, and Arnheim N Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. (1985), 230 (4732):1350-1354

Sambook J Analysis and cloning of eukaryotic genomic DNA. In: *Molecular cloning. A laboratory manual*. Vol. 2. 2. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. (1989).

Saugstad JA, Marino MJ, Folk JA, Hepler JR and Conn PJ RGS4 inhibits signaling by group I metabotropic glutamate receptors. *J. Neurosci.*, 18, 905-913.

Schwab SG, Knapp M, Mondabon S, Hallmayer J, Borrmann-Hassenbach M, Albus M, Lerer B, Rietschel M, Trixler M, Maier W and Wildenauer DB Support for association of schizophrenia with genetic variation in the 6p22.3 gene, dysbindin, in sib-pair families with linkage and in an additional sample of triad families. *Am.J.Hum.Genet.* (2003), 72 (1):185-190.

Schwab SG, Eckstein GN, Hallmayer J, Lerer B, Albus M, Borrmann M, Lichtermann D, Ertl MA, Maier W and Wildenauer DB Evidence suggestive of a locus on chromosome 5q31 contributing to susceptibility for schizophrenia in German and Israeli families by multipoint affected sib-pair linkage analysis. *Mol. Psychiatry*. (1997), 2, 156–160.

Schwab SG, Hallmayer J, Albus M, Lerer B, Eckstein GN, Borrmann M, Segman RH, Hanses C, Freymann J, Yakir A et al. A genome-wide autosomal screen for schizophrenia susceptibility loci in 71 families with affected siblings: support for loci on chromosome 10p and 6. *Mol. Psychiatry*. (2000), 5, 638–649.

Scott CTJ, Kosmidis C, Jia WJ, Singhal RP Investigation of desorbed species from matrix used in maldi. *AIP-Conference-Proceedings*. (1995), 329: 64-67.

Seeman P, Chau-Wong M, Tedesco J, Wong K Brain receptors for antipsychotic drugs and dopamine: direct binding assays. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1975); 72: 4376–4380.

Seeman P, Tallerico T Rapid release of antipsychotic drugs from dopamine D2 receptors: an explanation for low receptor occupancy and early clinical relapse upon withdrawal of clozapine or quetiapine. *Am J Psychiatry* (1999); 156: 876–884.

Seifert et al. Multiple differences in agonist and antagonist pharmacology between human and guinea pig histamine H1-receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2003), 305:1104.

Sham P. and McGuffin P Linkage and association. In McGuffin P, Owen MJ und Gottesman II (eds.) *Psychiatric Genetics and Genomics*. Oxford University Press, Oxford. (2002), pp. 55-73.

Shenton ME, Kikinis R, Jolesz FA, Pollak SD, LeMay M, Wible CG, Hokama H, Martin J, Metcalf D, Coleman M and . Abnormalities of the left temporal lobe and thought disorder in schizophrenia. A quantitative magnetic resonance imaging study. *N.Engl.J.Med.* (1992), 327 (9):604-612.

Sherrington R, Brynjolfsson J, Petursson H, Potter M, Dudleston K, Barraclough B, Wasmuth J, Dobbs M and Gurling H Localization of a susceptibility locus for schizophrenia on chromosome 5. *Nature*. (1988), 336 (6195):164-167.

Shifman S, Bronstein M, Sternfeld M, Pisante-Shalom A, Lev-Lehman E et al. A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. *American Journal of Human Genetics*. (2002), 71, 1296-1302.

Shintani F, Kanba S, Maruo N, Nakaki T, Nibuya M, Suzuki E, Kinoshita N, and Yagi G Serum interleukin-6 in schizophrenic patients. *Life Sci*. (1991), 49 (9):661-664.

Shirts BH, Nimgaonkar V. The genes for schizophrenia: finally a breakthrough? *Curr Psychiatry Rep*, (2004), 4:303-312.

Smirnov IP, Roskey MT, Juhasz P, Takach EJ, Martin SA, Haff LA Sequencing oligonucleotides by exonuclease digestion and delayed extraction matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Biochem*. (1996), 238: 19-25.

Stefansson H, Sarginson J, Kong A, Yates P, Steinthorsdottir V, Gudfinnsson E, Gunnarsdottir S, Walker N, Petursson H, Crombie C, Ingason A, Gulcher JR, Stefansson K, and Clair DS Association of neuregulin 1 with schizophrenia confirmed in a Scottish population. *Am.J.Hum.Genet*. (2003), 72 (1):83-87.

Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T, Ghosh S, Brynjolfsson J, Gunnarsdottir S, Ivarsson O, Chou TT et al. Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet*. (2002), 71, 877–892.

Stefansson H, Steinthorsdottir V, Thorgeirsson TE, Gulcher JR und Stefansson K Neuregulin 1 and schizophrenia. *Annals of Medicine*. (2004), 36, 62-71.

Stockmeier CA, DiCarlo JJ, Zhang Y, Thompson P, Meltzer HY Characterization of typical and atypical antipsychotic drugs based on in vivo occupancy of serotonin₂ and dopamine₂ receptors. *J Pharmacol Exp Ther* (1993); 266: 1374–1384.

Strachan T und Read AP. *Molekulare Humangenetik*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akad. Verlag. (1996).

Straub RE, Jiang Y, MacLean CJ, Ma Y, Webb BT, Myakishev MV, Harris-Kerr C, Wormley B, Sadek H, Kadambi B et al. Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet*. (2002), 71, 337–348.

Straub RE, Maclean CJ, O'Neill FA, Burke J, Murphy B, Duke F, Shinkwin R, Webb BT, Zang J, Walsh D et al. A potential vulnerability locus for schizophrenia on chromosome 6P24-22-evidence for genetic-heterogeneity. *Nat Genet*. (1995), 11: 287-293.

Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, Wagner L, Shenmen CM, Schuler GD, Altschul SF, Zeeberg B, Buetow KH, Schaefer CF, Bhat NK, Hopkins RF, Jordan H, Moore T, Max SI, Wang J, Hsieh F, Diatchenko L,

Marusina K, Farmer AA, Rubin GM, Hong L, Stapleton M, Soares MB, Bonaldo MF, Casavant TL, Scheetz TE, Brownstein MJ, Usdin TB, Toshiyuki S, Carninci P, Prange C, Raha SS, Loquellano NA, Peters GJ, Abramson RD, Mullahy SJ, Bosak SA, McEwan PJ, McKernan KJ, Malek JA, Gunaratne PH, Richards S, Worley KC, Hale S, Garcia AM, Gay LJ, Hulyk SW, Villalon DK, Muzny DM, Sodergren EJ, Lu X, Gibbs RA, Fahey J, Helton E, Kettman M, Madan A, Rodrigues S, Sanchez A, Whiting M, Young AC, Shevchenko Y, Bouffard GG, Blakesley RW, Touchman JW, Green ED, Dickson MC, Rodriguez AC, Grimwood J, Schmutz J, Myers RM, Butterfield YSN, Krzywinski MI, Skalska U, Smailus DE, Schnerch A, Schein JE, Jones SJM, Marra MA Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2002), 99:16899-16903

Suddath RL, Christison GW, Torrey EF, Casanova MF and Weinberger DR Anatomical abnormalities in the brains of monozygotic twins discordant for schizophrenia. *N.Engl.J.Med.* (1990), 322 (12):789-794.

Talkowski ME et al. Association of RGS4 Polymorphisms with Schizophrenia: Interactions with Gender (2003). <http://www.wpic.pitt.edu/research/schizgene/research/ASHG%2003%20RGS4%20Poster-final.pdf>

Tamura T, Araki Y, Yamaoka S, Inagaki K, Tanaka H Determination of methylation specificity of sequence-specific DNA methyltransferases using matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.* (1997), 25: 4162-4164.

Taranenko NI, Golovlev VV, Allman SL, Taranenko NV, Chen CH, Hong J, Chang LY Matrix-assisted laser desorption/ionization for short tandem repeat loci. *Rapid Commun Mass Spectrom.* (1998), 12: 413-418.

Taymans JM, Leysen JE, Langlois X Striatal gene expression of RGS2 and RGS4 is specifically mediated by dopamine D1 and D2 receptors: Clues for RGS2 and RGS4 functions. *J Neurochem.* (2003), 84: 1118-1127.

Teng J, Risch N The relative power of family-based and case-control designs for linkage disequilibrium studies of complex human diseases. II. Individual genotyping. *Genome Res.* (1999), 9(3): 234-241.

Tesmer JJ, Berman DM, Gilman AG & Sprang SR Structure of RGS4 bound to AIF4-activated G(α 1): stabilization of the transition state for GTP hydrolysis. *Cell.* (1997). 89, 251-261

Thaker GK. Current progress in schizophrenia research: application of emerging "gene chip" technologies in search of genes. *J Nerv Ment Dis.* (2002), 190(11):781.

Thaminy S, Auerbach D, Arnoldo A, Stagljari I Identification of novel ErbB3-interacting factors using the split ubiquitin membrane yeast two-hybrid system. *Genome Res.* (2003), 13: 1744-1753.

Thune JJ, Pakkenberg B Stereological studies of the schizophrenic brain. *Brain Res Rev* (2000), 31: 200-204

Tkachev D, Mimmack ML, Ryan MM, Wayland M, Freeman T, Jones PB et al. Oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia and bipolar disorder. *Lancet*. (2003), 362: 798-805.

Tsuang M Schizophrenia: genes and environment. *Biol.Psychiatry*. (2000), 47 (3):210-220.

Tsuang MT, Stone WS and Faraone SV Genes, environment and schizophrenia. *Br.J.Psychiatry Suppl*. (2001), 40:s18-s24.

Tsuang MT, Tohen M and Zahner GEP. *Textbook in Psychiatry epidemiology*. New York: Wiley-Liss. (1995).

van Os J, Marcelis M, Sham P, Jones P, Gilvarry K and Murray R Psychopathological syndromes and familial morbid risk of psychosis. *Br.J.Psychiatry*. (1997), 170:241-246.

Verdoux H and Sutter AL Perinatal risk factors for schizophrenia: Diagnostic specificity and relationships with maternal psychopathology. *Am.J.Med.Genet*. (2002), 114 (8):898-905.

Verdoux H, Geddes JR, Takei N, Lawrie SM, Bovet P, Eagles JM, Heun R, McCreddie RG, McNeil TF, O'Callaghan E, Stober G, Willinger MU, Wright P and Murray RM Obstetric complications and age at onset in schizophrenia: an international collaborative meta-analysis of individual patient data. *Am.J.Psychiatry*. (1997), 154 (9):1220-1227.

Volz H, Gaser C, and Sauer H Supporting evidence for the model of cognitive dysmetria in schizophrenia--a structural magnetic resonance imaging study using deformation-based morphometry. *Schizophr.Res*. (2000), 46 (1):45-56.

Weiland T and Chen C-K Regulators of G-protein signaling: a novel protein family involved in timely deactivation and desensitization of signaling via heterotrimeric G proteins. *Nauyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, (1999), 360, 14-26

Whitworth AB, Honeder M, Kremser C, Kemmler G, Felber S, Hausmann A, Wanko C, Wechdorn H, Aichner F, Stuppaeck CH and Fleischhacker WW Hippocampal volume reduction in male schizophrenic patients. *Schizophr. Res*. 31 (2-3):73-81.

Wilke I, Arolt V, Rothermundt M, Weitzsch C, Hornberg M and Kirchner H Investigations of cytokine production in whole blood cultures of paranoid and residual schizophrenic patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. (1996), 246 (5):279-284.

Williams J, McGuffin P, Nothen M and Owen MJ Meta-analysis of association between the 5-HT_{2a} receptor T102C polymorphism and schizophrenia. EMASS Collaborative Group. European Multicentre Association Study of Schizophrenia. *Lancet*. (1997), 349 (9060):1221.

Williams NM, Preece A, Spurlock G, Norton N, Williams HJ, McCreddie RG, Buckland P, Sharkey V, Chowdari KV, Zammit S, Nimgaonkar V, Kirov G, Owen MJ, O'Donovan

MC Support for RGS4 as a susceptibility gene for schizophrenia. *Biol Psychiatry*. (2004), 2:192-195.

Williams N et al. Replication of Schizophrenia Susceptibility Loci. *Am J Med Genet* (2003), 112B:16-17.

Wittchen HU, Zaudig M und Fydrich T. *Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV, Achse I und II*. Goettingen: Hogrefe. (1997).

Worrall TA, Schmeckpeper BJ, Corvera JS, Cotter RJ Allele-specific HLA-DR typing by mass spectrometry: an alternative to hybridization-based typing methods. *Anal Chem*. (2000), 72: 5233-5238.

Wright IC, Rabe-Hesketh S, Woodruff PW, David AS, Murray RM and Bullmore ET Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *Am.J.Psychiatry*. (2000). 157 (1):16-2

Wu KJ, Steding A, Becker CH Matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry of oligonucleotides using 3-hydroxypicolinic acid as an ultraviolet-sensitive matrix. *Rapid Commun Mass Spectrom*. (1993), 7: 142-146.

Xu X et al. RGS proteins determine signalling specificity of Gq-coupled receptors. *J. Biol. Chem*. (1999), 274, 3549–3456

Zheng B, De Vries L and Gist Farquhar M Divergence of RGS proteins: evidence for the existence of six mammalian RGS subfamilies. *Trends Biochem. Sci*. (1999), 24, 411–414.

Zhong H and Neubig R Regulator of G protein signaling proteins: novel multifunctional drug targets. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. (2001), 297, 837-845.

Danksagung

9 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Psychiatrischen Klinik des Klinikums der Universität München durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Rujescu und Frau Dipl. Psych. Giegling für die Möglichkeit zur Durchführung der vorliegenden Arbeit in ihrer Forschungsgruppe und vor allem für ihre jederzeitige prompte Hilfe.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Möller dafür, dass ich diese Arbeit in der von ihm geleiteten Psychiatrischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München durchführen durfte.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Freitag, Frau Dr. Gonnemann und Herrn Dr. Zipp für Rat und Tat.

Insbesondere Frau Dr. Hartmann werde ich mich immer verpflichtet fühlen, weil sie mir bei zahlreichen kleinen und großen Schwierigkeiten weitergeholfen hat.

Für die Unterstützung bei der deutschen Grammatik, Rechtschreibung und Formulierung danke ich meiner Frau.

Und für die umfassende Hilfe in allem danke ich Gott.

10 Lebenslauf

Geboren am 23.9.1969 in Sabzevar / Iran

Seit 2003 in Deutschland und seit 2004 verheiratet mit der Diplom-Biologin Brigitte Gentz

Studium

- 1987 – 1995 Medizinstudium an der Universität Zahedan / Iran
Abschluss: Medical Doctor
- 1994 Dissertation im Fach Dermatologie ‚Zusammenhang von
Lichen-Planus und Leberdysfunktion‘
- 1997 – 1998 Studium der Wissenschaftsphilosophie an der Universität
Teheran / Iran
- 2000 Berufsbegleitend Studium der Computerwissenschaft an der
Universität Sabzevar / Iran
- Seit August 2003 Promotion an der Ludwig-Maximilians-Universität, Arbeitsgruppe
Molekulare und Klinische Neurobiologie, Leiter PD Dr. Dan
Rujescu; Thema: Das RGS4 - Gen in der Schizophrenie

Beruflicher Werdegang

- Seit 5/2005 Assistenzarzt in der Geriatrie der Simssee-Klinik Bad Endorf
- 1998 – 2003 Allgemeinarzt in eigener Tages- u. Nachtpraxis
in Sabzevar / Iran
- 2001-2003 Lehrtätigkeit an der Medizinischen Fakultät Sabzevar 'Anatomie'
und 'Medizinische Terminologie'
Lehrtätigkeit an der Fakultät für Sportwissenschaft Sabzevar
'Erste Hilfe für Sportstudenten'
- 1998 – 2001 Teilzeittätigkeit Notfallmedizin-Chirurgie und Notfallmedizin-
Innere im Krankenhaus
- 1995 – 1997 Allgemeinarzt in staatlicher Ambulanz
Allgemeinarzt in Malaria- und Tuberkulose-Klinik

Hobbies

Bergwandern, Volleyball, Literatur, Philosophie